



Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200400006020
15/03/04 12:15:13

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS NUCLEOLARES NopA100 Y NopA64 EN RELACIÓN CON LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN *Allium cepa* L.

Fernando González Camacho

Licenciado en Ciencias Biológicas

Director: Francisco Javier Medina Díaz

Reg. F.H. 23.888

BIBLIOTECA FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Departamento de Biología de Plantas
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Madrid, 2004

Esta Tesis ha sido dirigida por el Dr. Francisco Javier Sánchez, quien me guió y apoyó en todas las etapas de mi trabajo. Agradezco especialmente a la Universidad por todas las oportunidades que me ha brindado y al personal que ha colaborado en el desarrollo de esta tesis. Agradezco también a mi familia por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

Quiero agradecer a las personas más importantes en mi vida, a mi familia, por el apoyo que me han brindado durante todo este proceso. Agradezco especialmente a mi madre, mi hermana y mis amigos por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

A mis amigos, Tania, Lora, Mariana y Mariana, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Agradezco especialmente a Vicky y David, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Agradezco también a mi familia por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

Quiero agradecer a la Dra. Consuelo de la Haza por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Agradezco especialmente a Alicia Prieto y Antonio Lora, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

No puedo olvidar a los profesores de la Universidad, especialmente a los profesores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Agradezco especialmente a los profesores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

Quiero agradecer a la Dra. Consuelo de la Haza por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Agradezco especialmente a Alicia Prieto y Antonio Lora, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

Esta Tesis ha sido dirigida por el Dr. Francisco Javier Sánchez, quien me guió y apoyó en todas las etapas de mi trabajo. Agradezco especialmente a la Universidad por todas las oportunidades que me ha brindado y al personal que ha colaborado en el desarrollo de esta tesis. Agradezco también a mi familia por su apoyo y comprensión durante todo este proceso.

Esta Tesis ha sido dirigida por el Dr. Francisco Javier Medina Díaz, sin su confianza y apoyo no habría sido posible. Muchas gracias por darme la oportunidad de introducirme en la Investigación, por todas sus enseñanzas, por la libertad de trabajo y pensamiento de la que he disfrutado en el laboratorio, por ser, además de un magnífico jefe, un compañero y un amigo que me ha dado sabios consejos tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias por todo.

Tengo que darle las gracias especialmente a Mercedes Carnota, esa bellísima persona, por el trabajo que hemos realizado codo con codo, sus consejos, y esos ratos de conversación tan necesarios en un laboratorio.

A mis amigos: Tarek, Cova, Maribel y Mamen, por ser incondicionales y soportar mis largos periodos de ausencia y destierro. A Lola, Gemilla, Juanma, Myriam, Oussama y Margarita, que tanto me han dado, y de los que tanto he aprendido, y muy especialmente a Vicky y David, ¡con los que tanto he compartido estos años!, y la amistad, paciencia y comprensión que me han mostrado. Gracias a Isabel y Matías por su empujón en la recta final.

Gracias a la Dra. Consuelo de la Torre, por estar siempre dispuesta a ayudar, a Alicia Prieto y Antonio Leal, por su amistad, y su ayuda siempre inteligente.

No puedo olvidarme a los vecinos de pasillo del "Centro Viejo" de los grupos de Concepción García, Susana Moreno y Pedro Castañera, con los que hemos compartido charlas, cafés y ayuda cuando se ha necesitado.

Desearía expresar mi agradecimiento a todos los amigos y compañeros del Centro que me han ofrecido su colaboración y apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Esta Tesis no habría sido posible sin la colaboración y asesoramiento de mucha gente, entre los que me gustaría destacar a Pedro Lastres por sus enseñanzas en la citometría de flujo, y las largas conversaciones en las tardes del "Centro Viejo"; Javier Varela y Emilia Aporta por dejarme entrar y salir de su laboratorio con total libertad; Mario García Lacoba por su infinita ayuda en las cuestiones bioinformáticas y estar

disponible siempre que le he necesitado; Marigel y Lolita por todo el apoyo prestado en el maravilloso mundo de la microscopía; Anabel y su grupo, por la ayuda prestada en la espectrometría de masas.

Hay muchas personas en el CIB que no han participado directamente en la elaboración de mi Tesis, pero con su apoyo y su presencia han colaborado en crear un ambiente tan acogedor en el que me he encontrado durante estos cuatro años que les estoy muy agradecido. A todo el personal del Servicio Técnico, de limpieza del Centro, Comedor y limpieza del material, especialmente a Bea, Carmen y Ramón.

A todas aquellas personas del CIB que han compartido conmigo fiestas, salidas nocturnas, excursiones y demás actividades extra laborales, que junto con el grupo de futboleros y otros deportes hemos disfrutado más allá del trabajo.

A mi familia González-Rubio, por su afecto y comprensión y el interés mostrado por mi trabajo durante todo este tiempo. Un cariño especial a mis sobrinos Ivan, Alberto y Vega.

A mis padres y hermanos, quienes me han dado todo su amor y comprensión, han sufrido mis cambios de humor y muchas veces mi silencio. Porque se lo merecen todo. A mis cuñados Roberto y Víctor, por el interés y seguimiento que siempre mostraron en todo mi período universitario. A mis queridos sobrinos Sandra y Víctor.

A Jana, el punto de equilibrio en mi vida, mi fuerza. Gracias por soportar mis pasiones y escucharme en esos largos monólogos sobre ciencia, por compartir conmigo cada minuto de nuestras vidas. Gracias por ser mi mujer.

Gracias a todos por haber formado parte del mejor período de mi vida.

Deseo expresar mi más sincera gratitud al Centro de Investigaciones Biológicas por los recursos que ha puesto a nuestra disposición, sin los cuales no habría sido posible la realización de este trabajo.

Por último, doy las gracias al Ministerio de Ciencia y Tecnología por haber financiado la elaboración de esta Tesis.

RESUMEN

En este trabajo se han analizado las propiedades físico-químicas de las proteínas nucleolares NopA100 y NopA64, que son mayoritarias en la fracción soluble de los núcleos de células en proliferación, aunque también presentan niveles significativos en la fracción más insoluble (matriz nuclear).

Las proteínas mostraron un incremento en la fase G2 del ciclo celular. Mediante inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica y electrónica, se observó una distribución desigual dentro del nucleolo, apareciendo principalmente en los componentes fibrilares. Un análisis mediante *Western blot* con anticuerpo anti-NopA100 mostró una banda principal a 100 kDa junto con una serie de proteínas relacionadas con ella, de menor tamaño. Este resultado sugiere que la NopA100 sufre un proceso fisiológico de maduración proteolítica, lo que fue confirmado mediante un tratamiento con un inhibidor de proteasas general, la leupeptina. Se observó una relación entre el incremento de la actividad del nucleolo y la actividad de la NopA100, el progreso en el ciclo celular y la maduración de la proteína. Hemos demostrado que las variaciones de la NopA100 durante la progresión del ciclo celular van acompañadas de una reorganización estructural del nucleolo, que es expresada en cambios cuantitativos de la contribución relativa de los diferentes subcomponentes nucleolares al volumen total del nucleolo. Consiguientemente, hemos diseñado un modelo estructural de la organización nucleolar para cada uno de los períodos de la interfase.

El conjunto de sus propiedades identifica a la NopA100 como una proteína homóloga a la nucleolina de mamíferos y a la NopA64 como un fragmento estable de la NopA100. Este hecho, junto con el análisis detallado de las secuencias de aminoácidos del resto de "proteínas semejantes a nucleolina" en otros organismos, confirma la alta conservación evolutiva que presenta, la cual es la consecuencia del papel funcional extraordinariamente relevante de esta proteína en la vida de la célula, interviniendo decisivamente en la regulación del ciclo celular y de la biogénesis de los ribosomas y en la coordinación de ambos procesos.

Mediante la combinación del fraccionamiento secuencial con la realización de geles bidimensionales, *Western blot* y tinción "AgNOR", hemos definido un conjunto de *spots* relacionados con la proliferación celular entre los que se encuentran la B23, NopA100 y NopA64 y hemos obtenido el patrón bidimensional para los dos estados, proliferativo y no proliferativo. Estas técnicas han puesto de manifiesto la gran importancia que tiene la fosforilación de algunas de estas proteínas, en particular de la NopA100, en la modulación de su actividad..

ABSTRACT

In this work we have studied the physico-chemical features of the nucleolar proteins NopA100 and NopA64, which are major proteins in the soluble nuclear fraction in proliferating cells, although they also display significant levels in the most insoluble fraction (nuclear matrix).

The levels of these proteins were higher in the G2 phase than in any other phase of the cell cycle. Their nucleolar distribution, studied by light and electron microscopy, was uneven, mainly appearing in the fibrillar components of the nucleolus. Western blot analysis with anti-NopA100 antibody revealed a major band at the level of 100 kDa and also the presence of a series of minor and smaller bands, which are the result of the proteolytic maturation of NopA100. This fact has been evidenced after treatment with leupeptin, a general protease inhibitor; a relationship between the increase in the activity of nucleolus, the activity of NopA100, the cell cycle progression, and the proteolytic maturation of the protein, has been postulated.

Variations of NopA100 through the cell cycle are accompanied by a structural reorganization of the nucleolus, which is expressed as quantitative changes in the relative contribution of the different nucleolar subcomponents to the whole nucleolar volume. Consequently, we have designed a structural model of nucleolar organization for each one of the interphase periods of proliferating cells.

Features of NopA100 show interesting analogies with those of mammalian nucleolin; on its part, NopA64 appears to be a stable fragment of the NopA100. Thus, both proteins should be included in the protein group known as "nucleolin-like" proteins. This fact, together with a detailed analysis of the amino acid sequences of the rest of "nucleolin-like" proteins in other organisms, confirms the high evolutionary conservation of nucleolin and its homologous proteins, which is the consequence of the highly relevant functional role played by this protein in the life of the cell, taking a decisive part in the regulation of the ribosome biogenesis and of the cell cycle, as well as in the coordination of the two processes.

By using a combination of sequential, functionally significant fractionation with bidimensional gel electrophoresis, Western blot, and AgNOR staining, we have defined a collection of spots related to cell proliferation, such as B23, NopA100, and NopA64, and we have got the bidimensional pattern for both actively proliferating and non-proliferating cells. These techniques have shown the importance of phosphorylation in the modulation of the activity of some proteins, particularly of NopA100.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
CLAVE DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
I.- APROXIMACIÓN A LA INVESTIGACIÓN ESPACIAL	3
II.- EL CICLO CELULAR	5
1. Regulación del ciclo	6
III.- EL NUCLEOLO	9
1. Organización nucleolar	10
2. Transcripción de los genes ribosómicos	12
2.1.- Procesamiento y maduración del pre-rRNA	13
IV.- PROTEÍNAS NUCLEOLARES	16
1. La nucleolina	17
2. Fibrilarina	20
3. Complejo RNA polimerasa I	21
4. Proteína B23	22
5. Nopp140	23
6. Proteínas AgNOR	24
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
I.- MATERIAL BIOLÓGICO	28
II.- TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO CELULAR. AISLAMIENTO DE NÚCLEOS	28
III.- FRACCIONAMIENTO PROTEICO DE LOS NÚCLEOS PURIFICADOS	29
IV.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	31
1. Ensayo de Lowry	31
2. Ensayo de Bradford	31
V.- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS OBTENIDAS EN EL FRACCIONAMIENTO	32

	<u>Página</u>
1. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida	32
2. Tinción con Azul Brillante de Coomasie	33
VI.- ANÁLISIS EN MEMBRANAS DE POLIVINIL DIFLUORATO (PVDF) DE LAS PROTEÍNAS ELECTROTRANSFERIDAS	33
1. Transferencia de proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de PVDF	33
2. Inmunomarcaje y detección por quimioluminiscencia	34
3. Tinción con nitrato de plata de las proteínas argirófilas de la Región del Organizador Nucleolar (proteínas AgNOR)	34
VII.- ESTUDIO DE PROTEOLISIS	35
VIII.- ENSAYO DE DESFOSFORILACIÓN	35
IX.- ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS	35
1. Primera dimensión. Isoelectroenfoque	36
2. Segunda dimensión. Gel SDS-PAGE	36
3. Tinción mediante nitrato de plata	37
X.- ESTUDIO PEPTÍDICO Y ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	37
1. Secuenciación N-terminal mediante la reacción de Edman	37
2. Estudio de péptidos y de aminoácidos mediante espectrometría de masas	38
3. Comparación de secuencias con las bases de datos (SwissProt y TrEMBL)	38
4. Análisis filogenético	39
5. Páginas Web de referencia	39
XI.- ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	40
1. Análisis mediante microscopía óptica	40
1.1. Preparación de muestras para microscopía óptica	40
1.2. Inmunofluorescencia sobre cortes semifinos	40
2. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión	41
2.1. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión	41
2.2. Inmunomarcaje	41
2.3. Cuantificación de las áreas de los nucleolos y de los granos de oro	42
XII.- ANÁLISIS DE SINCRONIZACIÓN DE MERISTEMOS	42
1. Preparación de las muestras	42
2. Análisis mediante citometría de flujo	42

	<u>Página</u>
3. Cálculo del índice mitótico	43
XIII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
RESULTADOS	44
I.- OBTENCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS NUCLEARES FUNCIONALMENTE SIGNIFICATIVAS. FRACCIÓN SOLUBLE Y MATRIZ NUCLEAR	44
1. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble en poblaciones meristemáticas y no meristemáticas	44
2. Estudio, mediante <i>Western blot</i> , de las proteínas NopA100 y NopA64	46
2.1- En la fracción soluble de los núcleos	46
2.2- En la fracción insoluble de los núcleos	47
3. Determinación de las proteínas detectadas mediante la tinción Ag-NOR.	47
4. Estudio de la fosforilación de la NopA100 y NopA64	49
5. Distribución intracelular de las proteínas	50
II.- ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.	53
1. Sincronización de la población meristemática de la raíz. Cálculo del índice mitótico	53
III.- ESTUDIO DE LA MADURACIÓN PROTEOLÍTICA DE LA NopA100	56
1. Efectos de la progresión del ciclo celular sobre los niveles de las proteínas NopA100 y NopA64 y las proteínas inmunológicamente relacionadas con ellas	56
1.1- En la fracción soluble de los núcleos	56
1.2- En la fracción insoluble de los núcleos	59
2. Evidencia de la maduración proteolítica de la NopA100.	60
3. Análisis de la maduración proteolítica durante el ciclo celular	61
IV.- ORGANIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS NUCLEOLOS EN LA INTERFASE Y DISTRIBUCIÓN "IN SITU" DE LAS PROTEÍNAS NopA100 Y NopA64	62

	<u>Página</u>
1. Cuantificación del tamaño de los nucleolos en las distintas etapas de la interfase	63
2. Distribución de los componentes subnucleolares en las diferentes etapas de la interfase	64
3. Distribución <i>in situ</i> de las proteínas NopA100 y NopA64 a lo largo de la interfase	68
V.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS SEPARADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	71
1. Análisis de la población meristemática <i>versus</i> no meristemática de la fracción soluble de los núcleos	71
1.1. Detección, mediante <i>Western blotting</i> , de isoformas de la proteína NopA100	75
a) En la fracción soluble de poblaciones celulares meristemáticas	75
b) En la fracción soluble de poblaciones celulares no meristemáticas	75
1.2. Detección, mediante <i>Western blotting</i> , de la proteína NopA64	78
a) En la fracción soluble de poblaciones celulares meristemáticas	78
b) En la fracción soluble de poblaciones celulares no meristemáticas	78
2. Análisis de la población meristemática <i>versus</i> no meristemática de la fracción insoluble de los núcleos	78
2.1- <i>Western blot</i> de la proteína NopA100 sobre células meristemáticas y no meristemáticas en la fracción insoluble de los núcleos	82
2.2- <i>Western blot</i> de la proteína NopA64 sobre células meristemáticas y no meristemáticas en la fracción insoluble de los núcleos	82
3. Determinación de la fosforilación, en geles bidimensionales, de la NopA100 en la fracción soluble de los núcleos	85
4. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas Ag-NOR de los <i>Western blot</i> de 2-D	85

	<u>Página</u>
CLAVE DE ABREVIATURAS	
VI.- ESTUDIO PEPTÍDICO Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA NopA100	88
1. Análisis peptídico de la proteína NopA100	88
2. Obtención de secuencias de aminoácidos de la NopA100	88
3. Estudio del extremo N-terminal de la NopA100 y análisis comparativo con otras proteínas	90
4. Análisis de identidad de las secuencias parciales e internas de la NopA100 con proteínas semejantes a nucleolina	93
VII.- ANÁLISIS DE HOMOLOGÍAS ENTRE PROTEÍNAS NUCLEOLINA Y SEMEJANTES A NUCLEOLINA Y SU ESTRUCTURA EN DOMINIOS EN DIFERENTES SISTEMAS MODELO	95
1. Análisis entre mamíferos	95
2. Análisis con el resto de cordados y el protozoo	98
3. Análisis de homologías entre las distintas proteínas semejantes a nucleolina de plantas y su estructura en dominios	101
4. Análisis de secuencias para las levaduras	106
5. Análisis filogenético de la nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina	107
VIII.- LAS PROTEÍNAS NUCLEOLARES Y EL CICLO CELULAR EN AUSENCIA DE GRAVEDAD	108
1. Introducción	-
2. La planificación, preparación y ejecución del experimento "ROOT" en la "Misión Cervantes"	109
DISCUSIÓN.	112
CONCLUSIONES.	128
BIBLIOGRAFÍA.	130
ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS	

CLAVE DE ABREVIATURAS

AgNOR	Tinión con plata del Organizador Nucleolar
BSA	Seroalbúmina bovina
BSN	Tampón de almacenaje de núcleos
CFD	Componente Fibrilar Denso
CFs	Centros Fibrilares
CG	Componente Granular
CKII	Caséina quinasa II
DAPI	Diamidinofenilindol
DOC	Desoxicolato sódico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilén-diamino-tetraacetato
ESA	Agencia Espacial Europea
ETS	Espaciador transcrito externo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAR	Región rica en Glicina y Arginina
IEF	Isoelectroenfoque
IGS	Espaciador intergénico
IM	Índice mitótico
IP	Yoduro de propidio
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
ISS	Estación Espacial Internacional
ITS	Espaciador transcrito interno
MAR	Región de unión a matriz
Mn	Matriz nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NopA64	Fosfoproteína nucleolar de <i>Alium cepa</i> de 64 kDa
NopA100	Fosfoproteína nucleolar de <i>Allium cepa</i> de 100 kDa
NOR	Región del Organizador Nucleolar
PFA	Paraformaldehído
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro
PVDF	Polivinil difluorato
rDNA	DNA ribosómico

RNPs	Ribonucleoproteína(s)
RRM	Dominio de reconocimiento del RNA
rRNA	RNA ribosómico
SDS	Dodecil sulfato sódico
snoRNA	RNA nucleolar de pequeño tamaño
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano

INTRODUCCIÓN

I.- APROXIMACIÓN A LA INVESTIGACIÓN ESPACIAL

La investigación de la respuesta de los sistemas biológicos al ambiente espacial tiene dos objetivos: en primer lugar, verificar los efectos de la exposición prolongada de los seres vivos a este ambiente, factor que es crítico para continuar con los planes de exploración espacial posteriores, que pueden llegar a incluir la colonización por el ser humano de otros planetas o cuerpos celestes. En segundo lugar, aprovechar las posibilidades ofrecidas por este tipo de experimentos para investigar los posibles efectos de parámetros físicos, en principio, inaccesibles a la experimentación habitual en Tierra y que actúan de forma permanente sobre los seres vivos, el más importante de los cuales es la gravedad.

La instalación espacial más importante que se ha construido con el propósito fundamental de posibilitar la investigación sobre los efectos de la ausencia de gravedad, es la Estación Espacial Internacional (ISS, *International Space Station*), que nace como consecuencia de una iniciativa conjunta (sin precedentes ni en este ni en otros campos) de las Agencias Espaciales norteamericana, japonesa, rusa, canadiense y la Agencia Europea del Espacio (ESA), en la que se enmarcan las iniciativas y contribuciones españolas. España es miembro fundador de la ESA desde 1975 y la investigación espacial viene ocupando un lugar en los sucesivos Planes Nacionales de Investigación. En el mes de octubre de 2003 ha tenido lugar la "Misión Cervantes", costeada por el Gobierno Español, en la que el astronauta Pedro Duque, miembro del Cuerpo Europeo de Astronautas, ha realizado experimentos en la ISS durante 7 días, incluyendo un experimento diseñado en nuestro laboratorio cuya preparación y resultados preliminares forman parte de la presente Memoria.

Dentro de los objetivos generales de la colonización espacial, el establecimiento de poblaciones estables de plantas en el espacio es un requerimiento para la explotación de los hábitats extraterrestres por el hombre. Para poder llevar a cabo este objetivo, es esencial conocer cómo la microgravedad afecta a los procesos básicos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. A nivel celular, uno de los procesos esenciales es la proliferación, y, como consecuencia de ella, el ciclo celular.

La existencia del ciclo celular es una característica evolutivamente muy conservada, lo que da idea de la importancia que tiene para la vida. La maquinaria celular que gobierna la proliferación celular y la progresión en el ciclo celular afecta a la regulación de todos los procesos básicos de la célula, como la expresión génica, síntesis de proteínas, vías energéticas, transducción de señales, etc. Entre estos procesos se encuentra la biogénesis de los ribosomas, cuya regulación está directamente ligada a los factores que controlan el crecimiento y la proliferación celular. Como se tendrá ocasión de constatar ampliamente a lo largo de esta Memoria, la relación se establece mediante las proteínas nucleolares, que son dianas de factores de proliferación y desempeñan un papel importante en la activación de diferentes etapas de la síntesis de los precursores ribosómicos y su procesamiento.

Los experimentos espaciales sobre proliferación celular han sido muy escasos, pero han mostrado una paradoja: los sistemas celulares de eucariotas simples, como los cultivos celulares de mamíferos, parecen ser sensibles y responder a la ausencia de la gravedad mediante cambios en sus niveles de proliferación y en las vías de la transducción de señales (Claasen y Spooner, 1994; Cogoli y Cogoli-Greuter, 1997; Lewis *et al.*, 1998), mientras que los sistemas multicelulares complejos, como los procesos de desarrollo embrionario que, en definitiva, resultan de la agregación organizada e interdependiente de multitud de procesos a nivel celular, aparentemente parecen no estar afectados (Marco *et al.*, 1996).

En el momento actual, los efectos específicos debidos a la influencia de la microgravedad en la regulación de la biogénesis de ribosomas y su relación con la maquinaria de proliferación celular y progresión del ciclo son prácticamente desconocidos. La biogénesis de los ribosomas está mediada por la asociación correcta de los genes, factores de transcripción y la maquinaria de procesamiento de los transcritos en un cierto dominio del núcleo, el nucleolo.

En este trabajo hemos caracterizado una serie de proteínas nucleolares durante la interfase que, por sus características, hacen de ellas unas buenas marcadoras para el estudio de los mecanismos de biogénesis de ribosomas y el control del ciclo celular y proliferación celular en plantas, así como de las relaciones entre ambos procesos. Además, se ha caracterizado mediante geles bidimensionales el patrón proteico de poblaciones meristemáticas y no meristemáticas de la raíz. Los resultados obtenidos en experimentos realizados con plantas crecidas en tierra se utilizarán como controles de

los mismos experimentos realizados con plantas crecidas en condiciones de microgravedad.

II.- EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con la división de una célula en otras dos células idénticas, un hecho esencial para el sostenimiento de la vida. El modelo clásico del ciclo celular con sus cuatro etapas fue definido por primera vez en 1953 por Howard y Pelc cuando demostraron que la síntesis del DNA ocurría durante un período discreto de la interfase. Sus cuatro fases son, G_1 , S, G_2 y M (figura 1). Las tres primeras se denominan conjuntamente interfase, que sería el periodo que transcurre entre una mitosis y la siguiente. Después de haberse dividido, la célula destinada a dividirse nuevamente entra en fase G_1 , pero si la célula ya no va a dividirse nuevamente, se dice que pasa a la fase G_0 , ya que ésta se retira del ciclo celular.

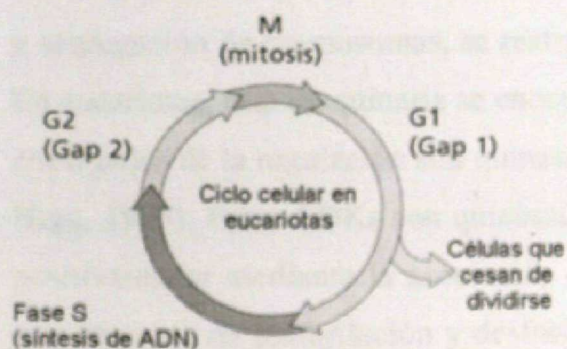


Figura 1.- Representación esquemática de las cuatro fases del ciclo celular.

Este período G_1 comienza después de que haya tenido lugar la citocinesis de la división anterior; La célula aumenta de tamaño y se sintetiza nuevo material citoplasmático. La célula hija en su origen es pequeña y posee un bajo contenido energético debido al gasto experimentado durante la mitosis, por lo que en este período se produce la acumulación del ATP necesario y el incremento de tamaño celular. En esta fase tienen lugar las actividades de la célula diferenciada, tales como secreción, endocitosis, actividades biosintéticas, etc. Es el período que más variación de tiempo presenta, pudiendo durar días, meses o años, aunque, por lo general, en células proliferantes sólo dura horas, y en levaduras, minutos.

Dado que el DNA contiene la información genética de la célula, antes de la mitosis deben generarse dos moléculas idénticas para ser repartidas entre las dos células. Al período en el que ocurre este proceso se le denomina fase S, o de síntesis o de replicación del DNA.

La fase **G₂** es el tiempo que transcurre entre la duplicación del DNA y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía, la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP. Esta energía acumulada durante la fase **G₂** se utilizará para el proceso de mitosis. En este período se ponen en marcha los controles que monitorizan si el DNA se ha replicado correctamente, el proceso que se denomina "chequeo **G₂**".

La fase **M** representa la mitosis; en esta etapa se produce el reparto, a cada célula, de una copia de la información genética, previamente duplicada en la fase **S**, y la división citoplasmática (citocinesis).

1. Regulación del ciclo

La progresión a lo largo del ciclo celular requiere de procesos altamente regulados por un número elevado de vías y puntos de chequeo en los que intervienen múltiples factores a través de la interacción de una compleja maquinaria molecular. Estos aseguran que los procesos críticos, como son la replicación y reparación del DNA y segregación de cromosomas, se realicen en condiciones óptimas (Pelayo *et al.*, 2001). En eucariotas, esta maquinaria se encuentra muy conservada y las principales moléculas encargadas de la regulación son quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Pines, 1995; Nigg, 1995). Estas CDKs son quinasas específicas de serina/treonina y están reguladas positivamente mediante la asociación de subunidades reguladoras llamadas ciclinas, y por procesos de fosforilación y desfosforilación de aminoácidos específicos. Dentro de sus secuencias están caracterizados algunos motivos específicos con función de unión a ATP, a ciclinas y sitios conservados de regulación por fosforilación (Segers *et al.*, 1998) en los que se fosforila un residuo de treonina a través de una quinasa activadora de CDK (CAK) (Fowler *et al.*, 1998). Las CDKs actúan fosforilando moléculas cruciales para la división celular. Entre los sustratos de los complejos CDK-ciclina se incluyen reguladores transcripcionales, proteínas del citoesqueleto, de la matriz nuclear, de la membrana nuclear y otras proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (Morgan, 1997; Nigg, 1995). En la actividad de las CDKs también son importantes ciertas proteínas que actúan como moduladores, como son las proteínas inhibidoras de las CDKs (CKIs), estas proteínas inhiben la progresión del ciclo celular al asociarse a las CDKs y formar complejos con ellas (Inzé *et al.*, 1999; Nakayama y Nakayama, 1998).

La función de las ciclinas, al formar complejos con las CDKs, es controlar su actividad, sustrato y localización subcelular. Realmente la complejidad del ciclo celular, tanto en plantas como en animales y levaduras, se ve reflejada por la existencia de muchos tipos de ciclinas y CDKs. En concreto, en las plantas se han identificado un gran número de ciclinas; *Arabidopsis* tiene alrededor de 30 genes para ciclinas (Vandepoele *et al.*, 2002). Renaudin (1996) clasificó las ciclinas de plantas, basándose en su similitud de secuencias, dentro de tres grupos, CycA, CycB y CycD, aunque posteriormente se identificaron otros dos, CycC y CycH (Yamaguchi *et al.*, 2000). El homólogo de la CycE de mamíferos no se ha encontrado en plantas, aunque sí se ha descrito un tipo de CycA que actuaría en el punto de chequeo G1/S (Yu *et al.*, 2003). De estos cinco tipos distintos, algunos de ellos incluyen, a su vez, varios grupos. La actuación de cada uno de los tipos de ciclinas viene determinada por la expresión de sus genes, la cual, en todos los casos, está regulada de manera dependiente del ciclo celular (figura 2). Los genes de las ciclinas del tipo B tienen un patrón de expresión específico de la fase G2/M; las ciclinas tipo A son expresadas en la fase S/G2 y caen drásticamente en el transcurso de la mitosis. A estos dos tipos, en conjunto, se les conoce como ciclinas mitóticas. La CycC no se conoce muy bien; se sabe que interactúa con los CDK7 y CDH8 de homólogos en plantas (Yamaguchi *et al.*, 2000). Las del grupo D son expresadas generalmente en todas las fases del ciclo celular, pero están involucradas específicamente en la transición G1/S. El quinto tipo corresponde a la ciclina H, a la que se ha implicado en la fase S y en la iniciación y elongación de la transcripción, (Yamaguchi *et al.*, 2000).

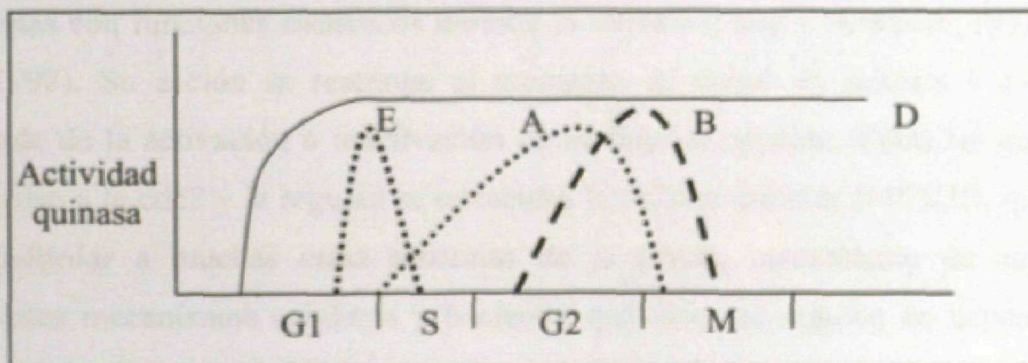


Figura 2.- Representación esquemática de la variación de las diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular. (Adaptado de Fowler *et al.*, 1998).

Por lo tanto, los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula a una fase u otra del ciclo, así que la dinámica del ciclo dependerá, entre otros sucesos, de las formas activas o inactivas de estos complejos.

Existen puntos de control en el ciclo celular que tienen como fin garantizar que la célula se encuentra en estado óptimo para progresar en el ciclo celular, controla el estado nutricional, la masa celular, los procesos de crecimiento y el mantenimiento de la fiabilidad e integridad de la replicación y reparación del DNA. La dinámica del ciclo celular está regulada por estos puntos de control que dependen de la transcripción de los genes de las CDKs y de las ciclinas, de las modificaciones postraduccionales de estas proteínas, o de la degradación de las mismas (Hengst *et al.*, 1994). Se conocen tres momentos en los que operan estos puntos en la interfase: uno al final de la fase G₁ y la entrada a la fase S, otro en la transición de la fase G₂ a la fase M y un tercero en la mitad de la fase S. En la mitosis existe un punto de control más, en la transición de metafase a anafase, que controla la disposición de los cromosomas en la placa metafásica (Elledge, 1996).

Para que la célula abandone la fase G₁ e ingrese a la fase S, es decir inicie la replicación del DNA, la ciclina D debe asociarse a CDKs que fosforilan la proteína relacionada con el retinoblastoma (RBR), que se relaciona con la familia de factores de transcripción E2F-DP1 que activan genes requeridos para la replicación del DNA (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Superada la fase G₂ se activa el inicio de la mitosis. Al final de G₂ la concentración de ciclinas mitóticas aumenta y, al alcanzar una determinada concentración, se unen a la cdc2 formando un complejo que se encarga de fosforilar proteínas con funciones esenciales durante la mitosis (Fang y Newport, 1991; Verde *et al.*, 1992). Su acción se restringe al momento de entrar en mitosis y su actuación depende de la activación o inactivación de su función quinasa. Entre las quinasas que fosforilan a la cdc2 y la regulan se encuentra la caseína quinasa II (CKII), que es capaz de fosforilar a muchas otras proteínas de la célula, controlando de esta manera, diferentes mecanismos celulares y haciendo que éstos se regulen en dependencia del ciclo celular (Litchfield, 2003).

Dentro de toda esta regulación existen otras señales, de tipo fitohormonal, que se integran dentro del ciclo celular. Las fitohormonas tienen un efecto global, promoviendo la división celular, en el caso de las citoquinas, giberelinas y auxinas, o inhibitorio, en el caso del etileno y ácido ascórbico, aunque según el tejido y órgano del

que se trate pueden tener diferentes efectos (Hirsch y Fang, 1994). Desde hace pocos años se conoce la existencia de una proteína semejante al retinoblastoma (RBR) en plantas, que, como se ha mencionado, participa en el control de la entrada en la fase S (Gutiérrez, 1998).

(Para revisiones ver: Doonan, 1996; Burssens *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 1998; Huntley y Murray, 1999; Mironov *et al.*, 1999; Stals e Inzé, 2001.)

III.- EL NUCLEOLO

El núcleo de células eucariotas contiene un número de dominios o subdominios estructurales que incluyen, además del territorio cromosómico o cromatínico, nucleolos, cuerpos nucleares de Cajal, *speckles* nucleares, focos de transcripción y replicación, fibrillas y gránulos pericromatínicos, gránulos intercromatínicos y algunas estructuras que se han descrito en modelos celulares concretos de las que no se puede afirmar su generalidad. El nivel de conocimiento que se posee de cada uno de estos dominios estructurales es muy variable. Puede darse el caso, incluso, de que bajo el mismo nombre se agrupen estructuras funcionalmente distintas, o que, al contrario, diferentes descripciones respondan a la misma función (Bouteille *et al.*, 1974).

En este contexto, el nucleolo es el territorio nuclear donde tiene lugar la transcripción del RNA ribosómico (rRNA) y la biogénesis de ribosomas. Esta conclusión fue sólidamente alcanzada tras un intenso y largo esfuerzo de diferentes laboratorios, y se fundamenta en la existencia de la denominada "Región del Organizador Nucleolar" (NOR), el segmento de la cromatina nucleolar que contiene los genes ribosómicos (rDNA), el cual se visualiza en mitosis como la "constricción secundaria" de determinados cromosomas, a partir de la que se genera el nucleolo en las células hijas tras la telofase (Perry *et al.*, 1961; Perry, 1962; Birnstiel *et al.*, 1966; Miller 1981). Sin embargo, recientemente, el nucleolo ha sido implicado además en otros aspectos de la biología celular que incluyen funciones como el silenciamiento de genes, senescencia, regulación del ciclo celular y secuestro de moléculas reguladoras (Olson *et al.*, 2002). Un número importante de virus y proteínas virales interactúan con el nucleolo y colocalizan con proteínas nucleolares como nucleolina, B23 y fibrilarina. Éstos virus tienen al nucleolo y a sus componentes como diana para favorecer la

transcripción viral, la traslocación y, quizás, alterar el ciclo celular para favorecer y promover su replicación (Hiscox, 2002).

Las células que se encuentran en proliferación activa requieren de una actividad óptima de síntesis de proteínas para poder mantener el estado proliferativo, la integridad metabólica y homeostática, y el reparto de cantidades adecuadas de materiales celulares a las células hijas. Puesto que la función de los ribosomas es la traducción de la información genética que dará lugar a la síntesis de proteínas, las funciones celulares asociadas a la proliferación dependen de la biogénesis de ribosomas, y el control de éstas es, necesariamente, un elemento clave para el control de la proliferación. De hecho, se ha comprobado experimentalmente que, bajo condiciones fisiológicas normales, la proliferación celular está acompañada de un incremento en la biogénesis de los ribosomas (Baserga, 1984; Hannan y Rothblum, 1995). El nivel de la actividad transcripcional está relacionado con la cantidad de maquinaria de transcripción del rDNA (Roussel *et al.*, 1996). La correlación positiva entre proliferación celular y la actividad de transcripción del rDNA se manifiesta en el núcleo con un aumento en el tamaño del nucleolo y un cambio en las proporciones de los componentes que lo forman (Medina *et al.*, 2000).

1. Organización nucleolar

Estructuralmente, el nucleolo contiene algunos componentes básicos comunes para prácticamente todos los tipos celulares: los centros fibrilares (CFs), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG), los cuales a veces están acompañados por otras estructuras como son las vacuolas e intersticios. Sin embargo, la organización y distribución de estos componentes es altamente variable, dependiendo del tipo celular y del estado metabólico (Risueño y Medina, 1986). Además, también se han encontrado diferencias estructurales para un componente, como es el caso de los CFs. En células animales muestran una estructura fibrosa con una densidad electrónica baja y uniforme, mientras que en células de plantas han sido descritos dos modelos morfológicos distintos, uno similar al de animales, llamado homogéneo, y otro mayor en tamaño y con inclusiones densas de cromatina condensada en su interior, llamado heterogéneo. En muchos casos, estas diferencias morfológicas reflejan cambios funcionales (Risueño *et al.*, 1982).

Las diferentes etapas de la biogénesis ribosómica no están estrictamente correlacionadas con los componentes estructurales del nucleolo (Medina *et al.*, 2000). Así, los genes ribosómicos están localizados en los componentes fibrilares (CFs y CFD). Los CFs son, probablemente, los lugares de anclaje de las acumulaciones focalizadas del rDNA y el territorio donde tiene lugar el ensamblaje del complejo de transcripción (RNA polimerasa I, topoisomerasa, factores de transcripción) y la activación de la cromatina para transcribir. Sin embargo, la transcripción efectiva de los genes del rRNA ocurre en puntos discretos en la zona de transición entre los CFs y el CFD, definiéndose un subdominio funcional en el que tiene lugar este proceso, que se definiría como "el área de transición CF-CFD" (Medina *et al.*, 1990; Martín y Medina, 1991).

El CFD es estructuralmente homogéneo, pero funcionalmente heterogéneo, ya que en él tiene lugar la transcripción (en su transición con los CFs) y distintas etapas, tanto tempranas como avanzadas, del procesamiento del pre-rRNA. La localización de las proteínas fibrilarina y nucleolina permite la definición de una zona proximal y distal en el CFD con respecto al CF (Martín *et al.*, 1992; Cerdido y Medina, 1995; Tao *et al.*, 2003).

Finalmente, el componente granular es el lugar donde se llevan a cabo las etapas tardías del procesamiento preribosómico, incluyendo el ensamblaje final de ciertas proteínas y la exportación de los ribosomas como partículas maduras al citoplasma. De esta manera se describe un modelo vectorial en cuanto a la biogénesis de los ribosomas, la cual se organiza de dentro hacia afuera, tomando los CFs como punto de partida (Scheer y Benavente, 1990; Cerdido y Medina, 1995).

Los complejos macromoleculares que forman el nucleolo interfásico no se desagregan en sus componentes simples durante la mitosis, sino que sólo se desensamblan de la superestructura nucleolar y se inactivan. No obstante, los complejos de transcripción permanecen localizados en el NOR mitótico donde, en asociación con el rDNA, se ha encontrado RNA polimerasa I, topoisomerasa I y el factor de transcripción UBF (Scheer y Hock, 1999). Los complejos de procesamiento están presentes en la periferia de los cromosomas (metafase y anafase) y en los cuerpos prenucleolares (PNBs) (anafase y telofase) (Medina *et al.*, 1995; Dundr *et al.*, 2000). Este sistema permite que las células dispongan de una carga de ribosomas basal nada más terminar la mitosis, de tal forma que se asegura la síntesis de proteínas desde el primer instante de la interfase.

Para el estudio del ciclo celular y proliferación celular, el nucleolo supone una herramienta clave debido a los cambios estructurales y moleculares que en él se producen, funcionando como un excelente marcador de proliferación. Estos cambios son fácilmente detectables y cuantificables mediante técnicas histoquímicas tales como la tinción con plata del organizador nucleolar (AgNOR) (Goodpasture y Bloom, 1975; Lischwe et al., 1979; Medina et al., 1996; Sirri et al., 1995). Gracias a esta característica, este método ha sido ampliamente utilizado para calcular la tasa de proliferación celular (Leek et al., 1991).

2. Transcripción de los genes ribosómicos

La transcripción de los genes ribosómicos es catalizada por una enzima específica, la RNA polimerasa I (RNA pol I), cuya actividad requiere la acción de factores de transcripción también específicos. El resultado de la transcripción de los genes ribosómicos es la formación de una molécula precursora de los diferentes rRNAs (el pre-rRNA), el cual sufrirá un procesamiento y maduración para formar las partículas prerribosómicas, que se transportarán al citoplasma para formar los ribosomas maduros (para revisiones ver Hadjiolov, 1985; Warner, 1990).

En realidad, en la biogénesis de los ribosomas participan las tres RNA polimerasas de eucariotas: la RNA pol I, como se ha dicho, transcribe el precursor del RNA ribosómico (pre-rRNA) en el nucleolo, la RNA pol II transcribe los mRNAs que codifican para las proteínas ribosómicas y algunos RNAs nucleolares de pequeño tamaño (snoRNAs) importantes para el procesamiento del pre-rRNA. Finalmente, la RNA pol III transcribe el rRNA 5S, los RNA transferentes (tRNAs) y algunos otros snoRNAs. Cualquiera de ellas es, en realidad, un gran complejo multienzimático, asociado con varias proteínas que participan a diferentes niveles del proceso y que se denominan factores de transcripción.

La organización de los genes ribosómicos (rDNA) consta de una unidad que se repite en múltiples copias dispuestas en tandem. El número de copias es muy variable entre los distintos organismos, llegando hasta las 7.000 en cebolla, uno de los modelos biológicos con un mayor grado de repetición. Contrariamente, las células de mamíferos (rata, ratón, humano) sólo presentan unas 100-150 copias de la unidad repetida. En todos los casos, cada unidad repetida está constituida por un espaciador intergénico (IGS) y una unidad de transcripción (figura 3a). El pre-rRNA transcrito sufre un procesamiento, y maduración dando lugar a los rRNAs maduros 5,8S, 18S y 25S (28S

en mamíferos), que finalmente se ensamblarán para dar lugar a las dos subunidades que conformarán los ribosomas: por un lado, la subunidad mayor del ribosoma, formado por los rRNAs de 5S, 5,8S, 25S y proteínas ribosómicas específicas y por otro la subunidad menor del ribosoma, formado por el rRNA de 18S y otras proteínas ribosómicas. Las dos subunidades presentan unos coeficientes de sedimentación de 60S y 40S respectivamente. (Para una revisión, amplia y bien documentada, sobre la organización estructural y regulación de la transcripción ver Hemleben y Zentgraf, 1994).

El pre-rRNA está constituido por un espaciador transcrito externo 5' (ETS 5') seguido de las secuencias del rRNA 18S; después se sitúan dos secuencias espaciadoras internas (ITS1 e ITS2) que flanquean al rRNA 5,8S, seguidos de la secuencia del rRNA de 25S y termina con la secuencia del espaciador transcrito externo 3' (ETS 3') (figuras 3a y 3b). El pre-rRNA es un precursor de 45S en mamíferos; en plantas el precursor primario no está bien caracterizado, aunque los datos disponibles apuntan que no es mayor de 40S. Los espaciadores transcritos que forman parte de él son secuencias más cortas en plantas que en mamíferos, pero las regiones que corresponden a rRNAs maduros están bien conservadas entre especies, sobre todo la correspondiente al rRNA 18S.

3.- Procesamiento y maduración del pre-rRNA

El procesamiento tiene lugar en diferentes etapas y subdominios del nucleolo y está mediado por endonucleasas y exonucleasas que realizan una serie de cortes para poder dejar libres los rRNAs finales (figura 3c). Los pre-rRNAs necesitan sufrir una serie de modificaciones covalentes, gracias a las cuales las secuencias que deben conservarse se preservan de la acción de las nucleasas. Las principales modificaciones son la 2'-O-metilación de la ribosa y la conversión de la uridina en pseudouridina (Eichler y Craig, 1994). Los mediadores de este proceso son complejos ribonucleoproteicos (snoRNPs) compuestos por snoRNAs y proteínas nucleolares específicas. Se han identificado más de 80 snoRNAs que son requeridos para estas modificaciones postranscripcionales, los cuales pueden ser clasificados en dos grupos definidos por la presencia de determinadas secuencias conservadas: el grupo de la "caja" (*box*) C/D y de la "caja" H/ACA. En levaduras y vertebrados el grupo snoRNA de la "caja" C/D se asocia con una serie de proteínas (Filipowicz y Pogacic, 2002) entre las que se encuentra la Nop1p (fibrilarina en plantas y animales); ésta es esencial y

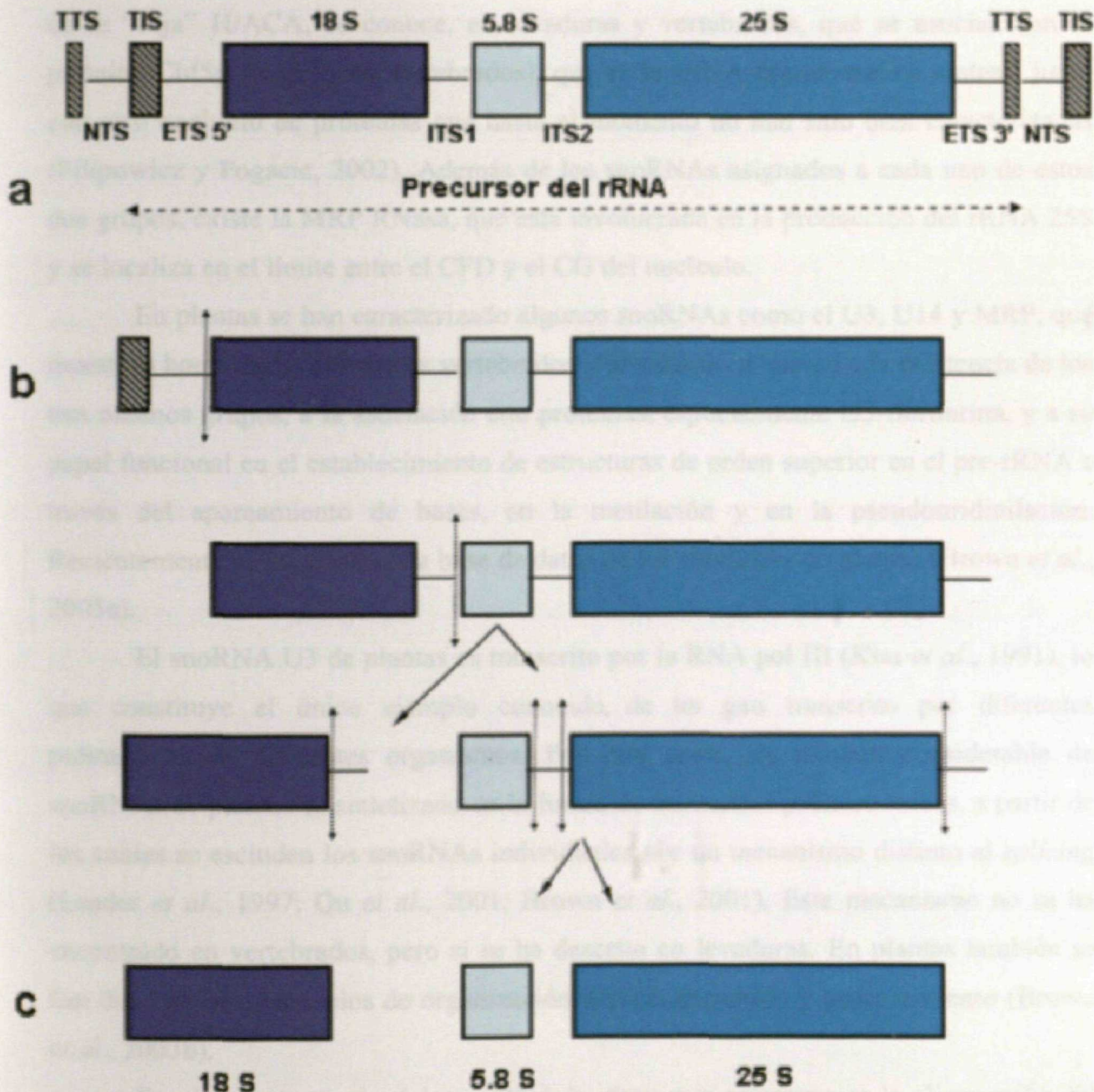


Figura 3.- (a) Esquema de la unidad repetida del gen del rRNA y su organización en tandem. La flecha indica la porción del rDNA que se va a transcribir a pre-rRNA. TTS: Secuencia de terminación de la transcripción. TIS: Secuencia de iniciación de la transcripción. NTS: Espaciador no transcrito. ETS: Espaciador transcrito externo. ITS: Espaciador transcrito interno. El conjunto del ETS 3', TTS, NTS, TIS y ETS 5' forman el Espaciador intergénico (IGS). **(b)** Pre-rRNA transcrito y su procesamiento. Las flechas verticales indican los lugares de corte que tendrán lugar durante el procesamiento. **(c)** Subunidades de rRNA maduras, tal como son exportadas al citoplasma y existen en los ribosomas.

requerida para la escisión del ETS 5' en el pre-rRNA, metilación de determinados residuos en el pre-rRNA y ensamblaje de ribosomas. En este caso, la fibrilarina probablemente tenga la función de metilasa de RNA (Barneche *et al.*, 2000). Entre los snoRNAs de este grupo se encuentran U3, U14 y U22. Respecto del grupo de snoRNAs de la "caja" H/ACA, se conoce, en levaduras y vertebrados, que se asocian con la proteína Cbf5p (NAP57 en vertebrados), que es la rRNA pseudouridina sintasa, junto con otro conjunto de proteínas que hasta el momento no han sido bien caracterizadas (Filipowicz y Pogacic, 2002). Además de los snoRNAs asignados a cada uno de estos dos grupos, existe la MRP RNasa, que está involucrada en la producción del rRNA 25S y se localiza en el límite entre el CFD y el CG del nucleolo.

En plantas se han caracterizado algunos snoRNAs como el U3, U14 y MRP, que muestran homologías con los de vertebrados y levaduras en cuanto a la existencia de los tres mismos grupos, a la asociación con proteínas, especialmente U3-fibrilarina, y a su papel funcional en el establecimiento de estructuras de orden superior en el pre-rRNA a través del apareamiento de bases, en la metilación y en la pseudouridinilación. Recientemente se ha creado una base de datos de los snoRNAs de plantas (Brown *et al.*, 2003a).

El snoRNA U3 de plantas es transcrito por la RNA pol III (Kiss *et al.*, 1991), lo que constituye el único ejemplo conocido de un gen transcrito por diferentes polimerasas en diferentes organismos. Por otra parte, un número considerable de snoRNAs de plantas es sintetizado en la forma de transcritos policistrónicos, a partir de los cuales se escinden los snoRNAs individuales por un mecanismo distinto al *splicing* (Leader *et al.*, 1997; Qu *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001). Este mecanismo no se ha encontrado en vertebrados, pero sí se ha descrito en levaduras. En plantas también se han descrito otros modelos de organización génica, expresión y procesamiento (Brown *et al.*, 2003b).

En el procesamiento del pre-rRNA la etapa más temprana es la eliminación del espaciador transcrito externo (ETS 5'), en la que se encuentran involucrados el U3, U14 y la fibrilarina. En una segunda etapa se escindirá el pre-rRNA mediante un corte en el extremo 3' del primer espaciador transcrito interno (ITS1). Finalmente, se elimina el ITS1 para generar el rRNA de 18S maduro, y se escinden el ITS2 y ETS 3' dando las partículas ribosómicas de 18S, 5,8S y 25S (figura 3). La asociación con proteínas ribosómicas comienza ya con el pre-rRNA naciente (Chooi y Leiby, 1981); de esta

manera, cuando el pre-rRNA se separa del rDNA ya está unido a un complejo de proteínas, tanto ribosómicas como no ribosómicas.

El procesamiento y maduración del pre-rRNA tiene una correspondencia en la organización espacial del nucleolo. Así, la localización del U14 corresponde con los lugares de transcripción del pre-rRNA naciente, en un subdominio del CFD en torno a los CFs, donde también tiene lugar el procesamiento temprano con la escisión del ETS 5' y producción del rRNA 18S. La distribución del U3 es mucho más difusa por el CFD; podría estar involucrado tanto en las etapas tempranas como en las tardías del procesamiento. Por su parte, el 7-2/MRP interviene en la escisión del ITS1 en etapas tardías, localizándose en el CG. Al snoRNA de vertebrados U8 se le atribuye la participación en la escisión tardía que da lugar al rRNA 25S y 5,8S y se localizaría en la zona periférica del CFD, inmediatamente al lado del CG (Beven *et al.*, 1996). (Para una revisión sobre snoRNAs y procesamiento del pre-rRNA en plantas, consultar Brown y Shaw, 1998).

Para completar la maduración que dará lugar a las dos subunidades ribosómicas citoplasmáticas (40S y 60S) deberán unirse el rRNA 5S, transcrito fuera del nucleolo, y un número elevado de proteínas ribosómicas, que formarán parte constitutiva de los ribosomas maduros. El ensamblaje tiene lugar en el nucleolo. Parte de las proteínas que intervienen en este proceso se encontraban asociadas desde el principio al pre-rRNA como ribonucleoproteínas y persistirán en el nucleolo durante la maduración y ensamblaje de las subunidades ribosómicas. Una vez constituidas las dos subunidades, viajarán al citoplasma, donde se completará el ensamblaje para dar lugar a los ribosomas maduros que mediarán la traducción o síntesis de proteínas.

IV.- PROTEÍNAS NUCLEOLARES

En el nucleolo se pueden encontrar dos grandes grupos de proteínas: las que van a formar parte de los ribosomas maduros, proteínas ribosómicas, y las que se van a asociar a los ribosomas de manera transitoria mientras intervienen en alguno de los procesos que conducirán a la formación de los ribosomas maduros, las proteínas nucleolares no ribosómicas (Olson, 1991). Dentro de estas últimas sólo algunas han sido bien caracterizadas. Aquí se incluyen algunas de las principales proteínas que se ven influenciadas por el ciclo celular y el estado proliferativo en el que se encuentre la célula, tales como la nucleolina, B23 y fibrilarina. Estas proteínas van a desempeñar un

papel decisivo en el control de las diferentes etapas de la biogénesis de los ribosomas, bien directamente, o bien como dianas de otros factores, involucrados en la regulación y control de las actividades de la célula.

1. La nucleolina

Esta proteína primero fue identificada y secuenciada en mamíferos. Originalmente se llamó C23 (Orrick *et al.*, 1973) y se ha visto que se encuentra conservada en plantas (Martín *et al.*, 1992; Didier y Klee, 1992; Bögre *et al.*, 1996; De Cárcer *et al.*, 1997) y levaduras (Nsr1 y Gar2) (Gulli *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1991) con un alto grado de homología estructural y funcional. Se trata de la proteína nucleolar mayoritaria, una fosfoproteína que, en células que se encuentran en proliferación activa, supone el 10% del total de las proteínas nucleolares, mientras que está fuertemente disminuida en células diferenciadas, habiendo una correlación entre su acumulación y la actividad proliferativa de la célula.

La nucleolina se encuentra organizada en tres dominios estructurales que a su vez reflejan dominios funcionales. En general, esta estructura modular puede ser encontrada en otras proteínas como la fibrilarina y la B23. El dominio amino terminal contiene una serie de secuencias ácidas separadas por regiones básicas que varían en número dependiendo de las especies. Este segmento de la proteína contiene muchos lugares potenciales para fosforilarse mediante cdc2 quinasa y caseína quinasa II (CKII) (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987, Belenguer *et al.*, 1990) y también contiene una secuencia de localización nuclear bipartita. El segundo dominio corresponde con la región central de la proteína y contiene cuatro dominios conservados de unión a RNA (RBDs o RRM) en vertebrados y dos en levaduras y plantas. Finalmente, el dominio carboxi terminal se caracteriza por estar muy conservado entre las distintas especies y ser una región rica en glicinas y argininas (dominio GAR) (Ginisty *et al.*, 1999, Tuteja y Tuteja, 1998). En cuanto a las funciones de cada región, los dominios amino y carboxi terminal median en las interacciones proteína-proteína como la interacción con histona H1, U3 snRNP y proteínas ribosómicas (Erard *et al.*, 1988; Bouvet *et al.*, 1998; Ginisty *et al.*, 1998); la región GAR también puede interactuar inespecíficamente con los ácidos nucleicos de cadena simple, mientras que la región central, mediante sus dominios de unión a RNA, media las interacciones con el pre-rRNA (Ghisolfi-Nieto *et al.*, 1996).

Si bien, el nombre "nucleolina" se aplica, en rigor, a la proteína de mamíferos, existe toda una serie de proteínas que se encuentran funcional y estructuralmente relacionadas con ésta en numerosos organismos; a estas proteínas se las conoce como semejantes a nucleolina ("*nucleolin-like*") (Tuteja y Tuteja, 1998).

A la nucleolina se le ha implicado en múltiples funciones, la mayoría de ellas relacionadas con la biogénesis de los ribosomas en la que desempeña un papel fundamental. Así, se le atribuye una participación en la estructura de la cromatina, transcripción del rDNA, procesamiento temprano de los transcritos, ensamblaje de ribosomas y transporte nucleolo-citoplasma. Incluso se le han atribuido funciones extranucleolares, como la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II, y se le ha encontrado en el "spliceosoma" del mRNA (Rappsilber *et al.*, 2002). Se ha propuesto que podría ser una de las primeras proteínas que intervendrían en el procesamiento del pre-rRNA; la nucleolina interactuaría con este sustrato participando en la formación del complejo de procesamiento por reclutamiento de diferentes factores, tales como el U3 snoRNP (Ginisty *et al.*, 1998). Se uniría al ETS 5' mediante su dominio de unión a RNA, siendo esta unión de nucleolina y pre-rRNA un requisito previo para la primera etapa del procesamiento, que ocurriría en el ETS 5' (Ginisty *et al.*, 1998), interviniendo en el correcto plegamiento del pre-rRNA que va a ser procesado (Allain *et al.*, 2000).

También se cree que podría desempeñar un papel importante en el ensamblaje del ribosoma, conduciendo a un correcto plegamiento del RNA. Para ello, promovería la formación de una estructura secundaria en los complejos del RNA y los otros componentes necesarios para la maduración del rRNA y/o ensamblaje del ribosoma (Sipos y Olson, 1991; Bouvet *et al.*, 2001).

En cuanto al transporte nucleolo-citoplasmático, podría haber una implicación del dominio GAR de la proteína mediante la metilación de algunas argininas, como ya se ha demostrado para las proteínas Npl3p y Hrp1p de *Saccharomyces cerevisiae*. (Shen *et al.*, 1998), aunque no se conoce con certeza. La metilación de este dominio podría ser, además, responsable de otras funciones como regular la unión de la nucleolina a ácidos nucleicos, o intervenir en las interacciones proteína-proteína, quizás en la estabilización de la proteína, o influir en su localización nucleolar Ginisty *et al.* (1999). Respecto de esto último, en la secuencia de aminoácidos de la nucleolina de algunos organismos se conocen las secuencias de localización nuclear, pero todavía no se ha dilucidado el responsable de su localización en el nucleolo; se ha demostrado que el

dominio GAR es necesario, pero no suficiente para su localización eficiente (Pellar y DiMario, 2003), y podría depender de la afinidad de varios de sus dominios por factores nucleolares (Schwab y Dreyer, 1997) u otros componentes de este dominio nuclear con los que interactúa (Li *et al.*, 1996).

Otras funciones atribuidas a la nucleolina, en relación con la cromatina y el DNA, son la modulación de la condensación de la cromatina mediante su interacción con la histona H1 (Erard *et al.*, 1988) y una actividad helicasa de ácidos nucleicos (Tuteja *et al.*, 1995). Lo particular de esta actividad en la nucleolina de humanos es que puede funcionar tanto como helicasa de DNA, como de RNA, como de los heteroduplex que se puedan formar entre estos ácidos nucleicos (Tuteja y Tuteja, 1996). Esta característica se conoce en muy pocas helicasas (Tuteja, 1997), ya que actúan principalmente sobre DNA o sobre RNA (Matson, *et al.*, 1994). Tuteja (1995) confirmó que la DNA helicasa IV de humanos era idéntica a la nucleolina, y como tal, presentaba actividad RNA helicasa, modulada mediante fosforilación.

La excepcional multifuncionalidad de la nucleolina es posibilitada por su estructura modular y por sus mecanismos de regulación mediante modificaciones postraduccionales como la fosforilación por parte de la cdc2 quinasa y la CKII, la escisión en otros productos proteolíticos y las metilaciones en su dominio GAR. Otros mecanismos probables de modulación son la tasa de expresión de la proteína (Jiang y Yung, 1999) y la presencia o ausencia de determinadas moléculas, como por ejemplo los pre-rRNA (Beven *et al.*, 1996; Yanagida *et al.*, 2001). En humanos también se ha visto implicada una proteína fosfatasa tipo 1δ en la desfosforilación de la proteína (Morimoto *et al.*, 2002). La participación de la nucleolina en el control de la transcripción del rRNA está íntimamente ligada a la fosforilación de la proteína, y ésta a su vez a la regulación del ciclo celular; así, las dos quinasas son el nexo de unión entre el ciclo celular, la proteína y la biogénesis de ribosomas.

La secuencia de aminoácidos de la nucleolina, tanto en animales como plantas, contiene motivos que corresponden a lugares de fosforilación de la CKII y cdc2 quinasa (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987; Peter *et al.*, 1990). La CKII fosforila en residuos de serina durante la interfase, participando en la regulación de la actividad transcripcional de los genes ribosómicos, mientras que la cdc2 quinasa lo hace en tirosinas en la mitosis, para modular el grado de condensación de la cromatina en conjugación con la histona H1. El estado de fosforilación de la proteína está íntimamente ligado al estado proliferativo de la célula.

La proteólisis de la proteína es otro mecanismo de modulación de su actividad. En poblaciones proliferantes, en las que la nucleolina es una proteína muy abundante, utilizando anticuerpos anti-nucleolina en *Western blot* de fracciones proteicas nucleares o nucleolares, se detecta una serie de bandas de menor peso molecular, inmunológicamente relacionadas, que corresponderían a una familia de proteínas procedentes de la proteólisis de la nucleolina (Bugler *et al.*, 1982). Esta proteólisis se encuentra estrechamente relacionada con la fosforilación; la combinación entre fosforilación y proteólisis es crucial para la actividad de la nucleolina, existiendo una correlación entre el nivel de síntesis del pre-rRNA y el proceso de maduración proteolítica de la proteína. Se apunta a que la fosforilación de la nucleolina por la CKII durante la interfase puede ser requerida para ser proteolisada entre el dominio N-terminal y central y esta proteólisis sería necesaria para liberar el complejo de transcripción, mientras los dominios central y C-terminal podrían permanecer unidos al rRNA y participar en el ensamblaje del pre-ribosoma. De esta manera, se ha propuesto que la proteína sin fosforilar se uniría al rDNA y reprimiría la transcripción (Lapeyre *et al.*, 1987).

Las diferentes funciones de la nucleolina podrían ser el resultado del ensamblaje de la nucleolina con otros factores para formar grupos complejos que actuarían de manera solidaria y coordinada. La nucleolina formaría parte de un complejo que organiza la estructura del pre-RNA y su maduración actuando como molécula chaperón (Allain *et al.*, 2000; Roger *et al.*, 2003). La primera evidencia de esto es la presencia de la nucleolina en el nucleolo bajo dependencia de la presencia del rRNA, mientras que puede residir en el nucleoplasma en ausencia de RNA (Markus *et al.*, 1998).

2. Fibrilarina

Esta proteína nucleolar se detectó por primera vez utilizando un suero autoinmune, en el componente fibrilar denso (CFD) del nucleolo (Ochs *et al.*, 1985), motivo por el que tomó el nombre. Se trata de una proteína altamente conservada en los distintos organismos eucariotas, en su secuencia, estructura y función. Tiene una masa molecular aparente de 34-37 kDa, y al igual que la nucleolina, se trata de una proteína modular, con un dominio de unión a RNA (RRM) en su parte central (Aris y Blobel, 1991), formado por dos secuencias altamente conservadas, el RNP1 y 2, que están directamente involucradas en diferentes etapas del procesamiento del pre-rRNA,

incluyendo su metilación (corresponde estructuralmente con una metiltransferasa) y el ensamblaje de ribosomas (Tollervey *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2000). Contiene un segundo dominio, el GAR, rico en residuos de glicinas y argininas, que también se encuentra presente en la nucleolina y que podría ser el responsable de que la proteína se dirija al nucleolo (Pih *et al.*, 2000).

La fibrilarina interactúa directamente con los snoRNAs del grupo de la “caja C/D” (snoRNA U3, U8 y U13) para formar un complejo snoRNP de procesamiento del pre-rRNA (Baserga *et al.*, 1991; Fatica *et al.*, 2000). Este complejo snoRNP participa en la primera etapa del procesamiento del pre-rRNA (excisión del ETS 5'). El proceso está guiado por la metilación del pre-RNA, en dependencia, a su vez, del mencionado grupo de snoRNAs, junto con la fibrilarina (Leader *et al.*, 1998).

En plantas se ha identificado la proteína homóloga mediante reacción cruzada con sueros autoinmunes humanos y se ha estudiado su distribución ultraestructural en interfase y mitosis, su presencia en la matriz nuclear y las variaciones de su acumulación en el nucleolo, dependientes del estado de diferenciación celular y de la fase del ciclo en la que se encuentre. Así, se presenta en mayor abundancia en células proliferantes que en no proliferantes, y los nucleolos en G2 contienen más del doble de proteína que en G1 (Medina *et al.*, 1995; Cerdido y Medina, 1995).

En cuanto a su distribución en el nucleolo, el lugar donde primero se describió fue el CFD, como ya se ha mencionado; sin embargo, un estudio más detallado mediante inmunolocalización en células de plantas en proliferación activa mostró que su distribución en el CFD no era homogénea, sino que se concentraba mayoritariamente en las zonas de transición entre los CFs y el CFD y decrecía hacia las zonas más distales del CFD (Cerdido y Medina, 1995).

3. Complejo RNA polimerasa I

La RNA polimerasa I (RNA pol I) es la enzima que específicamente transcribe los genes rRNA en el nucleolo de eucariotas, a excepción del 5S que es transcrito por la RNA pol III fuera del nucleolo. En diferentes organismos la RNA pol I fue purificada en forma de holoenzima compuesta por más de 30 polipéptidos, que en conjunto puede llegar a los 2 MDa de masa molecular. Saez-Vasquez *et al.* (2001) sugieren que la RNA pol I puede pre-asociarse con factores de transcripción en ausencia del DNA para formar la holoenzima, lo que sería autosuficiente para promover el reconocimiento e

iniciación de la transcripción. Utilizando anticuerpos contra las subunidades mayores de la RNA pol I en células de mamíferos, la enzima se localizó en los CFs del nucleolo y en la constricción secundaria de los cromosomas, que corresponde con el NOR, el cual, como se mencionó anteriormente, contiene los genes del rRNA (Scheer y Rose, 1984; Gilbert *et al.*, 1995); ciertamente, la presencia de la enzima no implica necesariamente que el proceso transcripcional esté ocurriendo en ese momento (Scheer y Rose, 1984; Weisenberger y Scheer, 1995).

Entre los factores de transcripción específicos para la RNA pol I, que regulan su actividad, el UBF (*upstream binding factor*) es el más conocido. Este factor ha sido estudiado en gran detalle en diferentes vertebrados (Reeder, 1990; Schnapp y Grummt, 1991) y se piensa que es una proteína altamente conservada en la evolución. Sin embargo, el grupo de Pikaard (Saez-Vasquez *et al.*, 2001) sugiere que el UBF sólo está presente en vertebrados. No obstante, hay evidencias de su existencia en plantas desde hace más de 10 años, cuando, en un experimento con un antisuero humano, se inmunolocalizó el UBF en células HeLa, *Xenopus*, protozoos, pollo y cebolla (Rodrigo *et al.*, 1992). Más recientemente se ha identificado el UBF de *Allium cepa*, en el CFD de los nucleolos (De Cárcer y Medina, 1999, Tao *et al.*, 2001). Aunque se ha descrito su presencia en diversos organismos, existe gran disparidad en cuanto a los pesos moleculares (Jantzen *et al.*, 1990; Pikaard *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1992), si bien, conservan su punto isoeléctrico en torno a 7 (Rodrigo *et al.*, 1992).

4. Proteína B23

La B23 es otra de las fosfoproteínas más abundantes en nucleolos de células que se encuentran en proliferación activa. También se la conoce como numatrina, nucleofosmina y NO38. Está ampliamente estudiada en animales, donde presenta una masa molecular de 35-40 kDa (Maridor y Nigg, 1990), pero en plantas es completamente desconocida.

Esta proteína se localizó por primera vez en el componente granular (CG) del nucleolo (Spector, 1984), aunque posteriormente también se la describió en el componente fibrilar denso (CFD). Al igual que la fibrilarina y la nucleolina se la implica en múltiples funciones, principalmente relacionadas con el ensamblaje de ribosomas en etapas tardías en el procesamiento de los preribosomas (Dumbat *et al.*, 1989; Szebeni y Olson, 1999). Otras funciones postuladas para esta proteína la definen

como lanzadera nucleocitoplasmática (Li *et al.*, 1996) y proponen su intervención en la regulación de la transcripción del rDNA mediante cambios estructurales en la cromatina (Okuwaki *et al.*, 2001) y en la duplicación del centrosoma (Okuda *et al.*, 2000). Muchas de estas funciones podrían ser reguladas mediante su fosforilación por diferentes quinasas de proteínas, entre ellas la CDKII/ciclina E (Okuda *et al.*, 2000) y por desfosforilación mediante la isoforma δ de la proteína fosfatasa tipo I (Kotani *et al.*, 1998). Ha sido asociada con la nucleolina y con la fibrilarina en la formación de complejos transitorios (Piñol-Roma, 1999; Li *et al.*, 1996).

Junto con la nucleolina, es la principal proteína responsable de la tinción AgNOR; por este motivo y por su dependencia de la proliferación celular, desempeña un papel relevante en los métodos de diagnóstico tumoral.

5. Nopp140

La Nopp140 es otra fosfoproteína nucleolar, que se ha descrito que actúa como lanzadera de las proteínas nucleolares fibrilarina y NAP57 entre el nucleolo y los cuerpos de Cajal, funcionando como enlace entre ambas estructuras (Isaac *et al.*, 1998). También parece servir de enlace entre el nucleolo y el citoplasma. Una de sus implicaciones mejor estudiadas es la de facilitar el ensamblaje y transporte de los snoRNPs. Es una de las pocas proteínas que se conozca que interactúe con los dos grupos principales de snoRNPs, los de caja C/D y H/ACA (Yang *et al.*, 2000). Mediante inmunoprecipitación se ha comprobado que la Nopp140 se asocia con NAP57, CKII y dos componentes integrales del snoRNP de la caja C/D, la fibrilarina y la NAP65. También coprecipita con proteínas componentes del snoRNP de la caja H/ACA, la NAP57 y GAR1 (Yang *et al.*, 2000). Además, la interacción Nopp140-snoRNP parece estar conservada en la evolución. La proteína Srp40p es la homóloga en levaduras (Meier, 1996) y parece interactuar con al menos una clase de snoRNP. También se le ha propuesto un papel en el mantenimiento de la estructura nucleolar y en la organización del nucleolo mediante su interacción con la RNA polimerasa I (Chen *et al.*, 1999).

Estas dos proteínas, la B23 y Nopp140, han sido ampliamente estudiadas en mamíferos y se ha demostrado su implicación en la biogénesis de los ribosomas y su dependencia del ciclo celular y proliferación celular. A pesar del conocimiento que se tiene de ellas en animales y levaduras, y de que se cree que son proteínas conservadas en la evolución, su estudio en plantas es prácticamente inexistente.

6. Proteínas AgNOR

Como se ha mencionado en apartados precedentes, los niveles de expresión de algunas proteínas nucleolares son dependientes de la actividad proliferativa de la célula, incrementándose fuertemente cuando se encuentran dividiéndose activamente. Esta característica puede aprovecharse para utilizar estas proteínas como marcadores de proliferación celular. La región del organizador nucleolar (NOR) puede ser detectada mediante la tinción específica por nitrato de plata, que se conoce como AgNOR. La diana de la tinción citoquímica es un grupo de proteínas que, consiguientemente, se denominan "proteínas AgNOR". Se ha establecido que la cantidad de estas proteínas varía dependiendo de la actividad celular (Leek *et al.*, 1991), y en clínica esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios de apoptosis (Kito *et al.*, 2003), procesos tumorales (Nanashima *et al.*, 2002) y en evaluación de pronósticos de cáncer en humanos (Derenzini *et al.*, 1995). Basándose en la afinidad por la plata de estas proteínas se han utilizado diferentes técnicas, tanto a nivel de microscopia óptica, como electrónica, y en metodologías bioquímicas. En realidad, la tinción preferencial del nucleolo por métodos argénticos fue ya puesta de manifiesto por Cajal hace más de un siglo (1903) y desde entonces viene utilizándose hasta nuestros días para el estudio del nucleolo.

En los últimos años, la realización de la tinción AgNOR sobre proteínas transferidas a membranas ha permitido identificar algunas de las proteínas que muestran afinidad por la plata, como la B23, la nucleolina (Roussel *et al.*, 1992; Hozák *et al.*, 1992) y una subunidad de la RNA polimerasa I (Masson *et al.*, 1990); también se han detectado una serie de bandas minoritarias que podrían corresponder a productos de maduración de la nucleolina y otra serie de bandas todavía no identificadas (Sirri *et al.*, 1995; Derenzini *et al.*, 1995). Se ha determinado que la intensidad de la tinción está en relación con la cantidad de proteína presente (Roussel *et al.*, 1994). En células proliferantes, más del 60% del valor de la tinción total es debido a la nucleolina y la B23 (Derenzini *et al.*, 1995, Sirri *et al.*, 1995). El grupo de Hernandez-Verdun (Sirri *et al.*, 1997) demostró que en células no proliferantes la nucleolina era prácticamente imperceptible con esta tinción, mientras que la B23 sí estaba presente, aunque en menos cantidad que en el período G1 de células proliferantes, y que la máxima expresión de la nucleolina se producía en G2. Sin embargo, nucleolina y B23 no fueron las únicas

proteínas detectadas dependientes de ciclo celular, ya que una proteína de 140kDa también se mostró dependiente.

El método de detección de proteínas en membranas de PVDF mediante la tinción AgNOR no ha sido utilizado hasta ahora en plantas. La propiedad de localizar proteínas relacionadas con el NOR e implicadas en proliferación celular sitúa a esta técnica como una herramienta importante para el estudio de estas proteínas, que son, a excepción de la nucleolina, prácticamente desconocidas en plantas.

Como hemos visto, las proteínas nucleolares no ribosómicas suponen un nexo de unión entre la proliferación celular, el ciclo celular y la biogénesis de los ribosomas, y deben estar implicadas en multitud de procesos que controlan estas funciones de la célula. En algunos casos, la participación sería actuando como receptores de estímulos cuyo efecto sería la modulación de determinadas etapas, y en otros casos como parte de mecanismos funcionales más complejos. Algunos de estos mecanismos son bien conocidos en algunos sistemas biológicos clásicos en la investigación (HeLa, levaduras), pero en plantas son prácticamente desconocidos.

Por todo ello, se hace urgente el estudio de estas proteínas en un sistema modelo vegetal, para conocer con exactitud la implicación de éstas en los mecanismos de proliferación celular, mecanismos responsables de la organización nucleolar, transporte nucleolo-nucleoplasma, interacciones proteína-proteína, composición de los snoRNPs, conservación filogenética y toda una serie de funciones trascendentales que se les atribuyen.

OBJETIVOS

Si bien, para algunas de las proteínas mencionadas en la Introducción, existen ciertas evidencias experimentales de su presencia en las células de *Allium cepa* y otras especies de plantas y de su participación en los procesos anteriormente mencionados, en general existe un gran desconocimiento de cuáles son las proteínas implicadas en la transcripción y procesamiento de los genes ribosómicos y sus mecanismos de control en células vegetales. No se conoce tampoco en plantas la relación de estas proteínas con la capacidad proliferativa de la célula y con el proceso del ciclo celular, aún cuando es un hecho bien conocido la estrecha relación de estos procesos con la biogénesis de los ribosomas. Por esta razón se ha considerado oportuno estudiar, en este sistema biológico, ciertas proteínas implicadas simultáneamente en la proliferación celular y en la transcripción de los genes ribosómicos y procesamiento del pre-rRNA, mediante un abordaje experimental basado en técnicas inmunológicas, bioquímicas, citoquímicas, ultraestructurales y bioinformáticas. Así pues, el objetivo general de esta Tesis es la **identificación de las proteínas que puedan estar implicadas en proliferación celular, así como en transcripción y procesamiento del pre-rRNA, y la caracterización de rasgos estructurales y funcionales de relevancia en algunas de ellas.**

Para conseguir este objetivo general nos hemos planteado una serie de objetivos concretos que han supuesto la utilización de toda una serie de abordajes de experimentación diversos a lo largo de la realización de este trabajo.

1.- La identificación y cuantificación de las proteínas nucleares que dependen de la proliferación celular, mediante el análisis y comparación de geles monodimensionales y bidimensionales de poblaciones celulares proliferantes y no proliferantes.

2.- El estudio de las proteínas nucleolares NopA100 y NopA64 a lo largo del ciclo celular mediante la utilización de anticuerpos específicos.

2.1. A nivel de localización celular, en los subcomponentes nucleolares, en relación al estado proliferativo y la fase del ciclo en el que se encuentre la célula, abordándolo tanto desde el punto de vista de la expresión cuantitativa de las proteínas, como de la redistribución de su localización *in situ*.

2.2. En las fracciones de proteínas nucleares funcionalmente significativas, como son el extracto soluble, enriquecido en ribonucleoproteínas, y la fracción insoluble perteneciente a la matriz nuclear.

2.3. Mediante el análisis de las modificaciones postraduccionales que pudiesen sufrir las proteínas, concretamente la fosforilación y la proteólisis.

3.- La definición y cuantificación de la ultraestructura nucleolar en las distintas etapas de la interfase, con el fin de establecer un modelo ultraestructural para cada uno de estos periodos.

4.- El estudio de las secuencias de aminoácidos de la nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina de las distintas especies en las que son conocidas, mediante el alineamiento de secuencias y la elaboración de árboles filogenéticos, con objeto de llegar a un análisis evolutivo lo más completo posible.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron células meristemáticas y no meristemáticas procedentes de la raíz de cebolla (*Allium cepa*, L.) obtenidas de bulbos germinados en agua filtrada. Las raíces crecieron durante 48 horas a 25°C con aireación y con cambios de agua cada 24 horas. Para la obtención de las células meristemáticas se tomaron los 3 primeros milímetros (mm) de la raíz tras descartar la cofia, y para las no meristemáticas (parenquimáticas), se desecharon otros 3 mm y se tomó el resto de la raíz.

II.- TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO CELULAR. AISLAMIENTO DE NÚCLEOS

Cuando las raíces de los bulbos tuvieron una longitud aproximada de 2 a 3 cm se diseccionaron separadamente los meristemos y las células parenquimáticas. Las porciones de raíces obtenidas se introdujeron en el medio de extracción para meristemos, basado en el medio descrito por Greimers y Deltour (1981) para células vegetales (goma arábiga 2%, glicerol 30%, ficoll 1,25%, dextrano 2,5%, seroalbumina bovina 100 µg/ml, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,5 mM, β-mercaptoetanol 8 mM, n-octanol 4 mM, Tris 25 mM, dietil pirocarbonato 6,8 mM, pH 7,4). Tras la toma de muestras se procedió a la desgasificación del medio en bomba de vacío durante 10 minutos para favorecer la penetración del medio dentro de las raíces.

Posteriormente se procedió a la homogenización de la muestra utilizando un equipo "Ultraturrax" de alta velocidad. Para obtener los núcleos aislados, el homogenizado se pasó por una combinación de mallas de filtro de poliamida superpuestos, con una luz de poro de 30, 50 y 100 µm, colocados de mayor a menor. El resto sólido retenido en el filtro se recogió y se volvió a resuspender en el medio de extracción repitiendo el proceso dos veces más. Todo el proceso se realizó sobre hielo.

Tras la homogenización y filtración se procedió al lavado de la siguiente manera: el filtrado se centrifugó a 2500 x rpm, 20 min a 4°C, el precipitado se resuspendió en medio de extracción y se centrifugó dos veces más. Al final del proceso el precipitado correspondió a los núcleos aislados. Éstos se resuspendieron en el medio

de almacenaje de núcleos (BSN: Tris/HCl 10 mM pH 7,4, Hepes 10 mM pH 7,4, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM, n-octanol 4 mM, sacarosa 240 mM, azida sódica 0,02%, espermidina 0,5 mM y espermina 0,15 mM). Para comprobar la limpieza y riqueza de los núcleos aislados se observaron al microscopio tras ser teñidos con verde de metilo o azul de toluidina.

Tanto el medio de extracción de meristemos como el de almacenaje de núcleos fueron suplementados con 1 μ g/ml de Aprotinina, 1 μ g/ml de Leupeptina, 1 μ g/ml de Pepstatina y PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro) 0,1 mM, como inhibidores de proteasas.

III.- FRACCIONAMIENTO PROTEICO DE LOS NÚCLEOS PURIFICADOS

El procedimiento para la obtención de las distintas fracciones de proteínas de núcleos está basado en el método descrito por el grupo de Penman (He *et al.*, 1990) y adaptado a nuestros requerimientos (De Cárcer *et al.*, 1995, 1997) (figura 4).

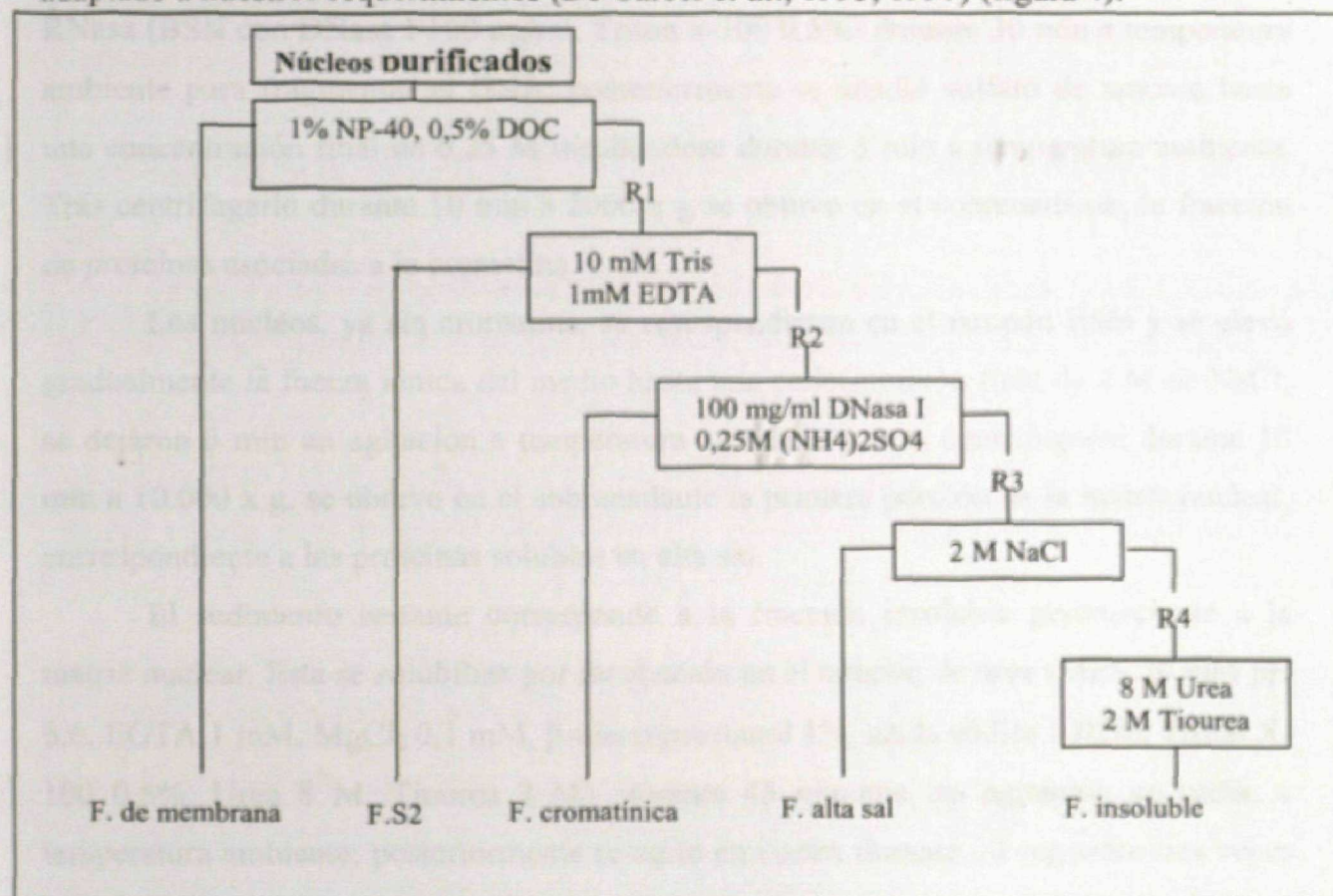


Figura.4.- Representación esquemática del fraccionamiento proteico de núcleos aislados.

El criterio fundamental en el que se basa el fraccionamiento es la solubilidad de las proteínas, aumentando la astringencia del medio en cada una de las etapas.

Partiendo de núcleos aislados se procedió al fraccionamiento secuencial de las proteínas. Los núcleos se trataron inicialmente con un tampón rico en detergentes (BSN complementado con Nonidet P-40 1% y desoxicolato sódico al 0,5%) durante 10 min a 4°C, en agitación en noria orbital; posteriormente se agitó en vortex dos veces de 20 segundos cada una y se centrifugó a 1000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante corresponde con la fracción de membranas nucleares y restos de citoesqueleto asociados a ellas (He *et al.*, 1990).

El precipitado se resuspendió en un tampón de baja fuerza iónica (Tris/HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8,0) y se incubó durante 1 hora a 4°C, en agitación en noria orbital. Tras centrifugar durante 10 min a 4°C y 1000 x g, el sobrenadante obtenido corresponde a la fracción de proteínas llamada S2 (Bourbon *et al.*, 1983).

Posteriormente, el precipitado, se resuspendió en un medio con DNasa I libre de RNasa (BSN con DNasa I 100 µg/ml, Triton x-100 0,5%) durante 30 min a temperatura ambiente para fragmentar el DNA; posteriormente se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 0,25 M incubándose durante 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugarlo durante 10 min a 2000 x g se obtuvo en el sobrenadante, la fracción de proteínas asociadas a la cromatina.

Los núcleos, ya sin cromatina, se resuspendieron en el tampón BSN y se elevó gradualmente la fuerza iónica del medio hasta una concentración final de 2 M de NaCl; se dejaron 5 min en agitación a temperatura ambiente y, tras centrifugarse durante 10 min a 10.000 x g, se obtuvo en el sobrenadante la primera porción de la matriz nuclear, correspondiente a las proteínas solubles en alta sal.

El sedimento restante corresponde a la fracción insoluble perteneciente a la matriz nuclear. Esta se solubiliza por incubación en el tampón de urea (MES 20 mM pH 6,6, EGTA 1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, β-mercaptoetanol 1%, azida sódica 0,02%, Triton X-100 0,5%, Urea 8 M, Tiourea 2 M), durante 45 minutos, en agitación en noria, a temperatura ambiente; posteriormente se agitó en vortex durante 30 segundos dos veces y finalmente se sonicó en el mismo tampón.

Las proteínas de cada sobrenadante obtenidas en cada fracción se precipitaron con ácido tricloroacético al 7% durante 2 horas a 0°C; posteriormente se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min. Las muestras se secaron en una centrífuga de vacío y se resuspendieron en tampón Laemmli (glicerol 10%, Tris/HCl 0,2 M pH 6,8, azul de

bromofenol 0,002%, dodecil sulfato sódico (SDS) 4%, β -mercaptoetanol 5%), para proceder a su separación electroforética.

IV.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

1. Ensayo de Lowry

Para valorar la concentración de las proteínas obtenidas en cada fracción se empleó el método de Lowry *et al.* (1951). Este método está basado en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{++} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos. Para resaltar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo Folin-Ciocalteu que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano da un color azulado.

Se tomaron 150 μl de muestra procedentes de las proteínas obtenidas en cada fracción y se añadieron 850 μl de agua destilada. A continuación se añadieron 2 ml de "solución C", compuesta de 25 ml de "reactivo A" y 0,5 ml de "reactivo B". El reactivo A está formado por Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N y el "reactivo B", por $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua destilada y CuSO_4 al 0,5%. Se dejó incubar durante 10 minutos.

Pasado este tiempo, se añadieron 200 μl de Folin-Ciocalteu al 50%, se agitó y después de 30 minutos se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro, ajustando previamente el valor cero con una solución carente de proteína.

La recta patrón se trazó utilizando la seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón a una concentración conocida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y sobre ella se calcularon las concentraciones de las muestras de proteínas en función a su absorbancia.

2. Ensayo de Bradford (Bradford, 1976)

Este método se utilizó cuando la composición del tampón en el que se encuentran las proteínas lo hace incompatible con la valoración por Lowry. Está basado en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante Azul Brillante de Coomassie G-250. El colorante cambia de color marrón a azul al unirse a proteínas.

Un volumen determinado de las muestras se disolvió en 100 μl de agua y se añadieron 5 ml de reactivo de Bradford (Bio-Rad) diluido. Se agitó para conseguir la

formación de complejos entre el Azul de Coomassie y las proteínas presentes. El color formado es estable entre 5 min y 1 hora después de la adición del reactivo, y en este intervalo se leyeron las densidades ópticas en un espectrofotómetro con luz visible a una longitud de onda de 595 nm.

La calibración del ensayo se realizó mediante la preparación de una curva, con seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón con concentraciones conocidas entre 20 y 140 $\mu\text{g/ml}$, intervalo para el que existe una relación lineal entre densidad óptica y concentración de proteína. Una vez obtenidos los datos de absorbancia correspondientes a las proteínas, se extrapolaron sobre la curva patrón para calcular las concentraciones.

V.- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS OBTENIDAS EN EL FRACCIONAMIENTO

1. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

Para analizar los extractos proteicos obtenidos a partir del fraccionamiento se utilizó la técnica de electroforesis en condiciones disociantes, según el método original descrito por Laemmli (1970).

Los diferentes extractos de proteínas resuspendidos en tampón Laemmli fueron separados mediante geles de electroforesis de poliacrilamida en condiciones reductoras, en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 12% y 5% de poliacrilamida para los geles separador y concentrador respectivamente, en una cubeta vertical de electroforesis del sistema mini Protean II de Bio-Rad.

Antes de cargar las muestras, se calentaron a 100°C durante 3 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La separación electroforética se produjo en tampón Tris-glicina-SDS, a una corriente constante de 50 mA para la entrada de la muestra en el gel concentrador, manteniendo posteriormente un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 2 horas.

Con el fin de identificar la masa molecular de cada banda de proteína se corrió, junto a los extractos, un patrón comercial de proteínas de masa molecular conocida (BioRad): Fosforilasa B (110 kDa), Seroalbúmina bovina (90 kDa), Ovoalbúmina (51,2 kDa), Anhidrasa carbónica (36,2 kDa), Inhibidor de tripsina (29 kDa) y Lisozima (21,4 kDa).

2. Tinción con Azul Brillante de Coomassie

Una vez terminada la electroforesis se procedió a la fijación de las proteínas introduciendo el gel en una solución de etanol:ácido acético:agua destilada (20:10:70), durante 10 minutos en agitador horizontal.

Pasado este tiempo se sumergió el gel en una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,3% en metanol:ácido acético:agua destilada (50:10:40) durante 40 min. Finalmente se decoloró el gel mediante la solución metanol:ácido acético:agua (25:10:65).

El gel se equilibró con agua Milli Q y unas gotas de glicerol para proceder a su secado, para lo cual se colocó entre dos papeles celofán y estos entre papel de filtro Whatman 3MM; el conjunto se introdujo en un secador de geles, aplicando calor y vacío para eliminar el agua.

Los geles, una vez secos, se introdujeron en un densitómetro "Bio-Rad" modelo GS-800 en el que se analizó la captura de imágenes digitales. A continuación se procedió al análisis densitométrico de estas imágenes mediante el programa "Quantity One" de Bio-Rad que permite la realización de estudios cuantitativos.

VI.- ANÁLISIS EN MEMBRANAS DE POLIVINIL DIFLUORATO (PVDF) DE LAS PROTEÍNAS ELECTROTRANSFERIDAS (*Western blotting*)

1. Transferencia de proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de PVDF

Las membranas utilizadas para la electrotransferencia fueron las "Hybond-P" de 0,45 μm (Amersham Pharmacia Biotech). Previamente a su utilización fueron humedecidas durante unos segundos en metanol (100%), lavadas con agua desionizada y equilibradas durante 20 min en el tampón de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8,3).

Se procedió apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro Whatman 3MM, el gel de poliacrilamida que contenía las proteínas, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente otra esponja plana, todos ellos previamente humedecidos en tampón de transferencia. Este conjunto se dispuso en

una cesta de plástico perforado y se introdujo en una cubeta de transferencia húmeda (BioRad) de tal manera que el gel quedó hacia el ánodo y la membrana hacia el cátodo.

La transferencia se realizó durante 1 hora y 15 min a 4°C, con una potencia máxima de 100 V, y una intensidad máxima de 300 mA.

2. Inmunomarcaje y detección por quimioluminiscencia

Los anticuerpos empleados fueron los obtenidos en nuestro laboratorio contra las proteínas nucleolares NopA64 y NopA100 (De Cárcer *et al.*, 1997).

Las membranas de PVDF con las proteínas transferidas se lavaron intensamente con tampón fosfato salino (PBS) y posteriormente se incubaron en solución de bloqueo, PBS Tween 20 al 0,05% y leche desnatada en polvo al 5% (PBST-leche), durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas, se lavaron con PBST y se incubaron con el anticuerpo primario a una dilución 1:500 en el caso del anticuerpo anti-NopA64 y 1:1000 para el anticuerpo anti-NopA100, en tampón PBST-leche, bien durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien a 4°C durante toda la noche. Después las membranas se lavaron intensamente con PBST y se procedió al marcaje con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, a una dilución 1:5000 en solución PBST-leche, durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se mantuvieron en agitación suave sobre plataforma oscilante. Después se lavó intensamente con solución PBST y se incubó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amesham, Little Chalfont, Reino Unido) revelándose sobre película radiográfica Kodak XUV film, analizándose finalmente en el densitómetro con el programa de Bio-Rad, "Quantity One".

3. Tinción con nitrato de plata de las proteínas argirófilas de la Región del Organizador Nucleolar (proteínas AgNOR)

La técnica utilizada es la descrita por Hozák *et al.* (1992) para la detección de proteínas AgNOR en membranas de PVDF. Las membranas con las proteínas transferidas se tiñeron en placas Petri de plástico. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua desionizada para evitar las reacciones inespecíficas de la plata. Las membranas fueron lavadas sucesivamente con PBST, PBS, agua, etanol al 20% y finalmente, de nuevo, con agua, durante 10 min cada uno.

Una vez lavada la membrana, se incubó en la solución de tinción durante 15 minutos en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente. La solución de tinción

consistió en una mezcla en proporción 2:1 (v:v) de "solución A" (AgNO_3 al 50% en agua) y "solución B" (gelatina al 2%, ácido fórmico al 1% en agua) respectivamente. Una vez teñidas las proteínas de la membrana, la reacción se paró añadiendo agua en abundancia. Posteriormente las membranas se secaron entre papeles de filtro, en un secageles, con vacío y calor. Por último se analizaron en el densitómetro GS-800.

VII.- ESTUDIO DE PROTEOLISIS

Para realizar el estudio del efecto proteolítico sobre la NopA100 los núcleos aislados y resuspendidos en medio de almacenaje de núcleos (BSN) se incubaron en presencia de un inhibidor general de proteasas, la leupeptina, a $10 \mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos a temperatura ambiente (Bouche *et al.* 1985). Posteriormente se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se continuó con el fraccionamiento nuclear como ya se ha descrito. Como control se incubaron núcleos de manera paralela, pero sin la adición de la leupeptina.

VIII.- ENSAYO DE DESFOSFORILACIÓN

Se utilizó el extracto de proteínas S2 recién obtenido y suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas ($1 \mu\text{g/ml}$ de aprotinina, $1 \mu\text{g/ml}$ de leupeptina, $1 \mu\text{g/ml}$ de pepstatina y PMSF $0,1 \text{ mM}$). Se añadieron 20 unidades de fosfatasa alcalina (Boehringer) por cada $20 \mu\text{g}$ de proteínas en tampón de fosfatasa alcalina o de desfosforilación (Boehringer) y se incubó durante 1h a 37°C . Para detener la reacción se añadió TCA al 7% y se resuspendió en tampón de rehidratación para isoelectroenfoque y posterior análisis bidimensional, o en tampón Laemmli para el análisis mediante geles SDS-PAGE. Como control negativo se realizó un ensayo paralelo sin añadir la fosfatasa alcalina.

IX.- ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS

Las proteínas de la fracción soluble (S2) y de la matriz de los núcleos de células meristemáticas y no meristemáticas se separaron en geles bidimensionales según dos

criterios, o dimensiones: atendiendo al punto isoelectrico de cada proteina, mediante la tecnica del isoelectroenfoque, en la primera dimension, y segun la masa molecular de cada una de las proteinas, mediante el procedimiento SDS-PAGE, en la segunda dimension, (O'Farrel, 1975).

1. Primera dimension. Isoelectroenfoque

Las proteinas precipitadas se resuspendieron en un tampón de rehidratación que contenia Tris 40 mM, Tiourea 2 M, Urea 7 M, Triton X-100 4%, DTT 100 mM, una mezcla de anfólitos al 2%, en proporción 2:1 de rangos de pH 4-7 y 3-10, y azul de bromofenol 0,002%. Para separar la mezcla de proteinas en función de su punto isoelectrico, se utilizaron los geles de BioRad de gradientes de pH inmovilizados (IPGs), de rangos lineales de pH que van de 3 a 10, y de una longitud de 7 u 11 centimetros. A cada tira se aplicaron 100 µg de proteina en 125 µl de tampón de rehidratación para las tiras de 7 cm y 185 µl para las de 11 cm.

Para la realización del isoelectroenfoque se utilizó la "protean ief cell" de BioRad. Para facilitar la penetración de las proteinas en las tiras se realizo una rehidratación activa a 50 V durante 12 horas, seguida de una etapa de bajo voltaje, (250 V durante 15 minutos). Seguidamente la corriente se aumento en rampa rápida hasta los 4000 V para las tiras de 7 cm y 8000 V para las de 11 cm. En este punto la corriente se mantuvo hasta acumular un total de 20.000 voltios-hora (Vh.) para las tiras de 7 cm y de 35.000 Vh. para las de 11 cm. La corriente se limitó a 50 µA por tira y todo el proceso se realizo a 18°C.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque las tiras IPG fueron equilibradas en un "tampón de equilibrado I" que contenia urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, glicerol 20%, y DTT 130 mM, durante 10 minutos a temperatura ambiente, y con el "tampón de equilibrado II" que cambia el DTT por 135 mM de iodoacetamida, otros 10 minutos, a temperatura ambiente.

2. Segunda dimension. Gel SDS-PAGE

Para separar las proteinas segun su masa molecular realizamos una segunda dimension. Para las tiras IPG de 7 cm se utilizó el kit de electroforesis "mini Protean II" de BioRad y para las tiras de 11 cm el kit "Protean II". Los geles de poliacrilamida se

realizaron sólo con separador al 10 ó 12%. Una vez polimerizado, sobre él se depositó agarosa al 0,5% y seguidamente se colocó la tira IPG, ya equilibrada.

Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF como se describió anteriormente (apartado VI.1) y detectadas por diferentes técnicas: inmunomarcaje (según apartado VI.2), tinción AgNOR (según apartado VI.3), o teñidas con Azul Brillante de Coomassie R-250 como se describe en el apartado V. 2, o con nitrato de plata.

3. Tinción general de proteínas mediante nitrato de plata

Para realizar la tinción con nitrato de plata se siguió el método descrito por Heukeshoven y Dernick (1988), ligeramente modificado. Primeramente las proteínas se fijaron en una solución de etanol:ácido acético:agua destilada (50:10:40) durante 40 min, seguida de una nueva incubación en etanol:ácido acético:agua destilada (5:1:94) durante 30 min. Después de realizar 3 lavados con H_2O , de 5 min cada uno, el gel se introdujo en una solución de $Na_2S_2O_3$ a una concentración de 0,2g/l, durante 1 min y se lavó con H_2O tres veces, de 30 segundos cada una. Posteriormente el gel se incubó en la solución de tinción compuesta por nitrato de plata 12 mM y 3 ml/l de formaldehído al 37%, en oscuridad durante 30 min, al cabo de los cuales se reveló con una solución de Na_2CO_3 a 0,28 M y 0,5 ml/l de formaldehído al 37 %. Este paso requiere dos cambios rápidos de la solución para prevenir la precipitación de las sales de plata en la superficie del gel. Cuando las manchas pertenecientes a las proteínas fueron visibles, la reacción se paró con una solución de ácido acético al 5%.

Todos los geles obtenidos fueron analizados con el programa "PD-Quest" (BioRad). Para cada condición a analizar se realizaron geles bidimensionales por triplicado de un mínimo de tres extracciones de proteínas independientes.

X.- ESTUDIO PEPTÍDICO Y ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

1. Secuencia N-terminal mediante la reacción de Edman

Las proteínas, separadas en gel SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de PVDF fueron teñidas con Azul Brillante de Coomassie R-250. La banda correspondiente a la proteína que se quiso secuenciar fue recortada y la proteína

analizada en el secuenciador automático de pulso líquido de Applied Biosystems, modelo Procise 494, que analiza mediante la degradación de Edman.

2. Estudio de péptidos y análisis de aminoácidos mediante espectrometría de masas

Tras la selección de los *spots* de interés para ser analizados, se recortaron de forma manual minimizando la cantidad de gel y se digirieron *in situ* manualmente con tripsina empleando un protocolo basado en el descrito por Shevchenko *et al.* (1996) con pequeñas modificaciones. Una pequeña alícuota (0,5 µl) del sobrenadante de la digestión fue analizada directamente en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight*), modelo Voyager (ABI) equipado con reflector, empleando HCCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) como matriz, en condiciones de saturación. Los espectros de masas obtenidos se utilizaron como “huella peptídica” para la identificación de proteínas en las bases de datos utilizando los motores de búsqueda (Mascot, Profound) accesibles en la red.

El resto del digerido se secó y se resuspendió en ácido acético al 0,5% en agua para su posterior análisis LC/RP-MS (cromatografía líquida en fase reversa-espectrometría de masas) en un espectrómetro de masas de tipo electrospray acoplado a trampa iónica (ESI-IT) modelo Deca-XP (Thermo-Finnigan, San José, California, USA) empleando una columna de 180 µm de diámetro interno a un flujo de 1,5 µl/m en modo micro-spray con una interface *metal leedle-kit* (Thermo-Finnigan). Los espectros de fragmentación obtenidos (ms/ms) se analizaron mediante el programa “Turboquest” (paquete Bioworks Browser) de Thermo-Finnigan para la identificación de proteínas. Los espectros que no presentaron homología con ninguna proteína presente en bases de datos se analizaron empleando el programa “DeNovoX” (Thermo-Finnigan) y las secuencias parciales obtenidas se utilizaron para encontrar homologías empleando el programa FASTA (University of Wisconsin, Madison WI, USA).

3. Comparación de secuencias con las bases de datos (SwissProt y TrEMBL)

Para la obtención de las secuencias de aminoácidos de las proteínas nucleolina y semejantes a nucleolina disponibles en Internet se procedió a la búsqueda en las bases de datos de proteínas Swiss-Prot y TrEMBL. Después de la obtención de las secuencias

de proteínas de interés, éstas se utilizaron para buscar identidades con las secuencias de péptidos obtenidas a partir de la NopA100.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas con las secuencias obtenidas por la degradación de Edman o por espectrometría de masas se realizó mediante los programas LALIGN o SIM que permiten el alineamiento entre secuencias.

El programa LALIGN usa un algoritmo de alineamiento. Este programa utiliza el algoritmo de Huang y Miller (Huang y Miller, 1991), y forma parte del programa de análisis de secuencias FASTA.

SIM es una herramienta de alineamiento para secuencias de proteínas. Trabaja bajo el servicio de ExPASy (*Expert Protein Analysis System*), que es el servicio proteómico de la Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), dedicado al análisis de secuencias de proteínas y estructuras, al igual que de geles bidimensionales.

Para la realización de alineamientos múltiples de secuencias completas de aminoácidos se utilizó el programa CLUSTAL-W (Thompson, *et al.*, 1994), programa disponible en Internet, utilizando los parámetros que ofrece por defecto.

4. Análisis filogenético

Para comprobar la relación evolutiva de la nucleolina con el resto de proteínas descritas como semejantes a ella en otros organismos, se realizó un análisis filogenético. Para ello se tomaron las secuencias de aminoácidos disponibles en las bases de datos Swiss-Prot o TrEMBL en formato FASTA (tabla 4) y se construyó el árbol filogenético.

Para el diseño del árbol filogenético se utilizó el algoritmo CLUSTAL-W, seguido de la corrección de distancias mediante el algoritmo "Jukes-Cantor Distance" utilizado en los programas "Distances" y "Growtree" pertenecientes al "GCG package" (Accelrys, CA, USA).

El árbol filogenético obtenido fue contrastado con otro realizado mediante el paquete de programas PHYLIP (PHYLogeny Inference Package).

5. Páginas Web de referencia

ExPASy: <http://us.expasy.org>

Swiss-Prot y TrEMBL: <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/access.html>

LALIGN: <http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN.form.html>

SIM: <http://us.expasy.org/tools/sim-prot.html>

CLUSTAL-W: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

PHYLIP: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

XI.- ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

1. Análisis mediante microscopía óptica

1.1.- Preparación de muestras para microscopía óptica

Los meristemos de *Allium cepa* se fijaron durante 2 horas a temperatura ambiente con formaldehído, recién preparado a partir de paraformaldehído, al 4 % en PBS complementado con 0,5% de glutaraldehído (pH 7,4), (en adelante se designará a este fijador así preparado como PFA). Durante los primeros 15 min se mantuvieron en bomba de vacío para facilitar la penetración del fijador en las muestras.

Tras la fijación se realizaron repetidos lavados en PBS seguido del bloqueo de aldehídos libres, primero con dos pases de borohidruro sódico al 0,5% de 30 min cada uno y posteriormente con 40 mM de glicina durante 30 min. Tras varios lavados en PBS las muestras fueron deshidratadas en una serie de alcoholes, infiltradas e incluidas en la resina acrílica "Immunobed", según las instrucciones de uso del fabricante. Se realizaron secciones semifinas de 2 μ m de espesor utilizando un "Pyramitome LKB" con una cuchilla de vidrio, las cuales se montaron sobre cubreobjetos tratados con aminopropiltrietoxilano (APTES) al 2 % o poli-lisina al 0,1 %.

1.2.- Inmunofluorescencia sobre cortes semifinos

Las muestras sobre cubreobjetos se rehidrataron en una serie de alcoholes en PBS y se bloquearon con solución de bloqueo (PBS suplementado con 2 % de BSA) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario con dilución 1:100 en solución de bloqueo durante 1 hora 30 min a 37°C. Tras lavados intensos en PBS se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa 488 (Molecular Probes) durante 1 hora, a 37° C, con dilución 1:100 en solución de bloqueo. Después de ser lavados con PBS fueron incubados con DAPI (2 μ g/ml) para teñir el DNA, durante 5 min, se lavaron intensamente en PBS, posteriormente en agua y se montaron sobre

portaobjetos con medio de montaje Mowiol, durante toda la noche a 37° C para prevenir el decaimiento de la fluorescencia. El control negativo del inmunomarcaje consistió en la omisión del anticuerpo primario.

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Zeiss Axiovert dotado de un dispositivo de epifluorescencia y se capturaron imágenes digitales con una cámara CCD Photometrics modelo CE 200A.

2. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión

2.1.- Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron fijadas, deshidratadas e infiltradas del mismo modo que para la microscopía óptica. Para la infiltración e inclusión se utilizó la resina acrílica LR-White (London Resin Company). Tras la polimerización de la resina se talló en cada bloque una pirámide, previa selección de la zona en cortes semifinos, al microscopio óptico y se realizaron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo Reichert Ultracut. Las secciones se montaron en rejillas de níquel recubiertas de una película de Formvar (TAAB).

2.2.- Inmunomarcaje

Las rejillas conteniendo las muestras se incubaron sucesivamente con solución de bloqueo conteniendo BSA al 2 % en PBS suplementado con Tween 20 al 0,5 % (PBST) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de la incubación con el anticuerpo primario con una dilución 1:50 en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente en anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm, diluido 1:50 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de cada incubación las rejillas fueron lavadas en PBST tres veces, diez minutos cada una. Al final del proceso también fueron lavadas con agua y teñidas con acetato de uranilo al 5 % durante 20 min en oscuridad. Después de tres lavados, se tiñeron con citrato de plomo al 0,3 % durante 5 minutos, se lavaron en H₂O dd intensamente, se secaron y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (modelos Philips EM 300 ó JEOL 1230) a 80 kV de tensión de aceleración. Se realizaron controles negativos del marcaje, consistentes en la omisión del anticuerpo primario.

2.3.- Cuantificación de las áreas de los nucleolos y de los granos de oro

Para el estudio de los nucleolos en cuanto a su tamaño y distribución de los distintos componentes estructurales, así como sus variaciones a lo largo del ciclo celular, se utilizó el programa de tratamiento y análisis de imágenes "QWin" de Leica.

XII.- ANÁLISIS DE SINCRONIZACIÓN DE MERISTEMOS

Con el fin de evaluar los cambios en las proteínas estudiadas a lo largo de la interfase, y cuantificar las variaciones y redistribución de los diferentes componentes estructurales del nucleolo, se procedió a la sincronización de los meristemos de las raíces mediante el tratamiento con hidroxiiurea, un agente que bloquea la progresión del ciclo celular en G1-S.

1. Preparación de las muestras

Los bulbos, crecidos como se describió al comienzo de este capítulo, fueron transferidos a una solución de hidroxiiurea 0,75 mM en agua, durante 14 horas a 25°C, con aireación y en oscuridad. Transcurrido este periodo, las raíces fueron intensamente lavadas y los bulbos transferidos a agua libre de la droga. Se tomó un gramo de muestra a 0 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 10 horas de recuperación, para la extracción de proteínas y el análisis por citometría de flujo, y se incluyeron, junto a esta secuencia, muestras procedentes de 8 horas de recuperación, para la realización de los estudios a nivel de microscopía. Todos los tiempos a los que se tomaron muestras para la obtención de proteínas tienen un umbral de incertidumbre de $\pm 0,33$ horas.

2. Análisis por citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo se realizó a partir de núcleos aislados de una población meristemática control, sin tratamiento, y de poblaciones tratadas con hidroxiiurea. Se realizaron tomas a diferentes tiempos tras la recuperación de la droga, para comprobar la fase del ciclo celular en la que se encontraba cada toma. Para ello se utilizó el citómetro EPICS XL (Coulter Corporation, Dunstable, R.U.). Los núcleos se incubaron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (IP) (Waring, 1965) y 2 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa libre de DNasa durante 20 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Los tres periodos de la interfase (G1, S y G2) se determinaron mediante la medición, en escala lineal y a

600 nm, de la fluorescencia emitida por el IP. La excitación del fluorocromo se analizó con luz emitida a 488 nm por un láser de gas argón. Sólo se consideraron aquellas muestras que presentaron, en el histograma del DNA, un bajo coeficiente de variación, entre 0 y 5% para G1.

3. Cálculo del índice mitótico

Las raíces sincronizadas fueron fijadas en PFA al 4% en buffer PBS, pH 7,5, suplementado con 5 mM de $MgSO_4$ y 10 mM de EGTA, durante 2 horas a temperatura ambiente, en bomba de vacío. Posteriormente se lavaron tres veces con el mismo buffer, 10 minutos cada vez. Se continuó con la digestión de las paredes celulares, sumergiendo las raíces en un cóctel de enzimas formado por celulasa al 2%, peptinasa al 1%, macerozima al 0,5% y manitol 0,4 M, en PBS, durante 1 hora a 37°C previamente desgasificado durante 15 minutos en bomba de vacío. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Los meristemos se colocaron entre dos cubreobjetos secos, uno de ellos tratado con poli-lisina a 1 mg/ml. Sobre este montaje se realizó el aplastado y se congeló a -20°C. Se separaron los cubreobjetos, se tiñeron con DAPI a 1 µg/ml durante 5 minutos, se lavaron intensamente, se montaron en un portaobjetos y se contaron las células al microscopio óptico de fluorescencia. El índice mitótico (IM), que representa el porcentaje de células en mitosis, fue determinado por conteo de, al menos, 5 muestras y 1000 células por muestra.

XIII.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los estudios cuantitativos que implicaron la comparación de datos entre distintas poblaciones celulares o fases del ciclo celular, se realizó la prueba t Student para analizar la significación de las diferencias postuladas. Este método de análisis estadístico compara las medias de dos categorías dentro de una variable dependiente, o las medias de dos grupos diferentes. Es una prueba paramétrica que arroja el valor estadístico t. Según sea el valor de t corresponderá un valor de significación estadístico determinado. Según los grados de libertad tendremos los siguientes valores de significación: $p > 0,05$ – no significativo; $p \leq 0,05$ – significativo (*); $p \leq 0,01$ – muy significativo (**); $p \leq 0,001$ – altamente significativo (***).

RESULTADOS

1.- OBTENCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS NUCLEARES FUNCIONALMENTE SIGNIFICATIVAS. FRACCIÓN SOLUBLE Y MATRIZ NUCLEAR

Para el análisis de las proteínas nucleares hemos tomado, después de un fraccionamiento secuencial basado en el aumento de la astringencia, la fracción soluble de los núcleos llamada S2, y la insoluble, correspondiente con la matriz nuclear (Mn). El extracto S2 es funcionalmente significativo, se encuentra enriquecido en ribonucleoproteínas (RNP) activas en el metabolismo del RNA nuclear en general y nucleolar en particular, incluyendo la síntesis y procesamiento del pre-rRNA. Está presente el 70-80% del RNA nuclear (Dunham y Bryant, 1983). Entre las RNPs del extracto se han identificado proteínas implicadas en la síntesis y procesamiento de precursores ribosómicos como la RNA polimerasa I (Busch *et al.*, 1978), la caseína quinasa (Busch *et al.*, 1978), factores de transcripción de la RNA pol I (Schnapp *et al.*, 1990), la fibrilarina (Cerdido y Medina, 1995), la nucleolina (Bugler *et al.*, 1982) y la CKII (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1982). El extracto insoluble de proteínas corresponde con la matriz nuclear. En esta fracción se localizan proteínas que están involucradas en la organización estructural y funcional del núcleo.

1. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble en poblaciones meristemáticas y no meristemáticas

Los núcleos de las células meristemáticas de la raíz de cebolla (tejido altamente proliferativo) fueron purificados (figura 5) y sometidos a extracción secuencial de proteínas. En paralelo, el mismo número de núcleos de células parenquimáticas de raíz de cebolla (tejido no proliferativo) fueron extraídos de la misma manera. Se encontraron diferencias en cuanto a la contribución relativa del núcleo a la masa celular entre los dos tipos celulares. Los meristemos de raíz produjeron 40×10^6 núcleos por gramo de tejido fresco, mientras que de un gramo de tejido parenquimático fresco se obtuvieron 18×10^6 núcleos. Sin embargo, con respecto a la masa de proteínas por núcleo ambas

muestras tuvieron una *ratio* similar, 24 μ gr de proteína por millón de núcleos para el tejido meristemático y de 21,7 μ gr para los núcleos del tejido no meristemático.

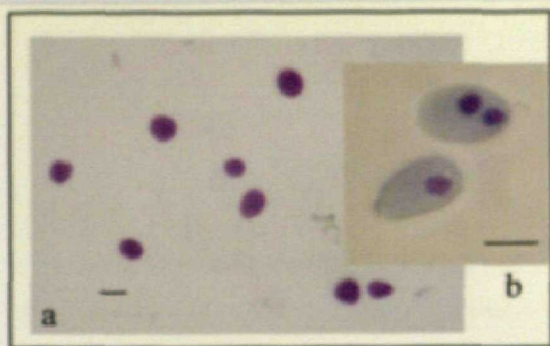


Figura 5.- (a) Núcleos aislados de células meristemáticas de la raíz de cebolla, teñidos con azul de toluidina. (b) Detalle de dos núcleos. La barra de aumentos representa 10 μ m.

Las proteínas solubles en tampón de baja fuerza iónica (extracto S2) y las proteínas insolubles, fueron obtenidas de los dos modelos celulares y separadas por SDS-PAGE para la comparación de los patrones electroforéticos obtenidos. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie y las bandas visualizadas fueron cuantificadas y analizadas densitométricamente. En la muestra meristemática de la fracción S2 pudimos detectar 26 bandas en el rango comprendido entre 130 kDa y 20 kDa de masa molecular (figura 6, carrera 1), mientras que en la muestra no meristemática, el número de bandas fue reducido a 18 (figura 6, carrera 2). Como previamente fue observado (Cerdido y Medina, 1995; De Cárcer *et al.*, 1997), las bandas principales identificadas en células meristemáticas, mostraron una clara reducción en intensidad (absoluta y relativa) en células no meristemáticas con la excepción de la de 51 kDa. Para la fracción de la matriz nuclear el número de bandas es menor, 18 para la población meristemática (figura 6, carrera 3) y 12 para la no meristemática (figura 6, carrera 4).

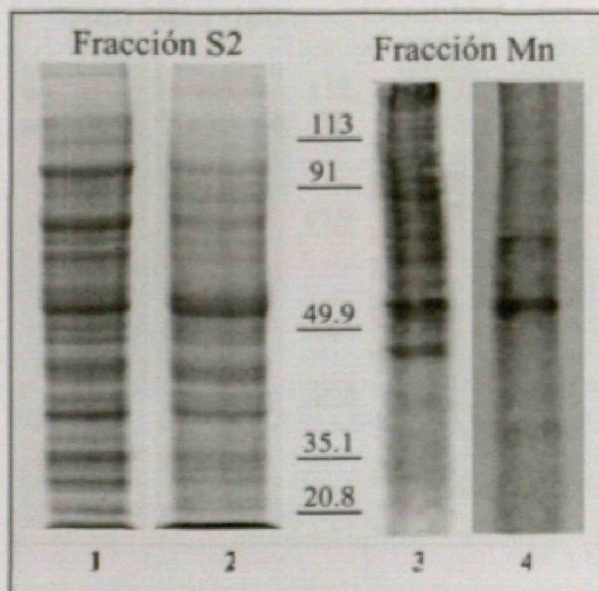


Figura.6.- SDS-PAGE de las fracciones proteicas solubles e insolubles de los núcleos de células meristemáticas y no meristemáticas de *A. cepa*. (1) Extracto S2 de muestras meristemáticas. (2) Extracto S2 de muestras no meristemáticas. (3) Fracción de la matriz nuclear de muestras meristemáticas. (4) Fracción de la matriz nuclear de muestras no meristemáticas. Los patrones de peso molecular se indican en kilodaltons.

2. Estudio, mediante *Western blot*, de las proteínas NopA100 y NopA64

2.1- En la fracción soluble de los núcleos

Las proteínas presentes en la fracción soluble de los núcleos, de células meristemáticas y no meristemáticas, fueron separadas en un gel de electroforesis y transferidas a membranas. La muestra meristemática incubada con anticuerpo contra la NopA100 presentó una banda mayoritaria en torno a este peso molecular, junto con otras ocho más, con masas moleculares de 95 kDa, 85 kDa, 75 kDa, 70 kDa, 64kDa, 60 kDa, 54 kDa y 46 kDa respectivamente. El mismo anticuerpo también detectó una banda de 120 kDa (figura 7, carrera 1), que en poblaciones no meristemáticas está fuertemente disminuida. En estas muestras no meristemáticas la NopA100 es patente, pero mucho menos intensa que en la población meristemática. Junto a esta disminución de las proteínas de 120 y 100 kDa se le suma la práctica desaparición de las bandas por debajo de este peso (figura 7, carrera 2).

Las muestras meristemáticas y no meristemáticas también fueron incubadas con un anticuerpo contra la proteína NopA64, descrita como homóloga a la nucleolina de mamíferos en cebolla (De Cárcer *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2001). Este anticuerpo detectó dos bandas mayoritarias, a 64 y 61 kDa respectivamente, para la muestra meristemática. Junto a estas bandas, también se reconoció una banda a 100 kDa (figura 7, carrera 3), mientras que para la muestra no meristemática esta banda no se detecta, y de las dos mayoritarias, la de 64 kDa se ve reducida siendo la de 61 kDa la banda más intensa (figura 7, carrera 4).

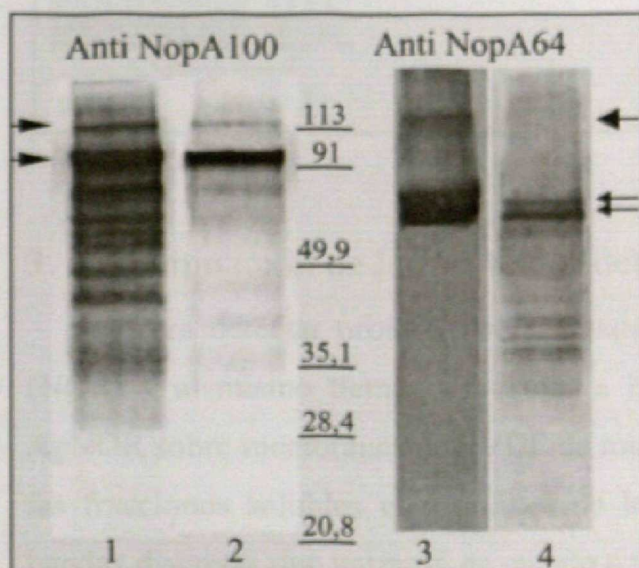


Figura 7.- Detección de la NopA100 (carreras 1 y 2) y de la proteína NopA64 (carreras 3 y 4) en muestras meristemáticas (carreras 1 y 3) y no meristemáticas (carreras 2 y 4). Las flechas, en las carreras incubadas con anticuerpo contra la NopA100, muestran la proteína mayoritaria y su precursor. Las flechas, en las carreras incubadas con anti NopA64, muestran las dos bandas principales a 64 y 61 kDa y el precursor de 100 kDa. Los pesos moleculares se expresan en kDa.

2.2- En la fracción insoluble de los núcleos

La detección inmunológica mediante *Western blot* en la fracción insoluble de los núcleos revela profundos cambios en relación con la fracción soluble. En la población meristemática, con el anticuerpo contra la NopA100 (figura 8, carrera 1) se detectan tres bandas, a 100, 64 y 61 kDa respectivamente. En este caso no se detecta ni la proteína de 120 kDa ni la "escalera" de bandas que se detectaban en la fracción soluble por debajo de este peso. Para las muestras no meristemáticas, la banda de 100 kDa prácticamente desaparece, mientras que las bandas a 64 y 61 kDa siguen siendo patentes (figura 8, carrera 2). Para la NopA64 se detectan dos bandas a 64 y 61 kDa en las muestras meristemáticas, y a diferencia de la fracción soluble, no da reacción con ninguna banda a 100 kDa (figura 8, carrera 3). Para la muestra no meristemática sólo se detecta una banda mayoritaria de 64 kDa (figura 8, carrera 4).

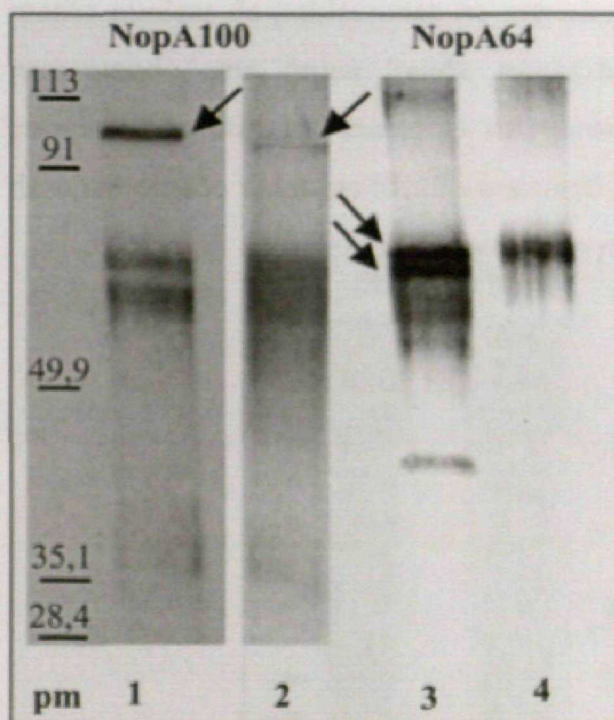


Figura 8.- Detección inmunológica de la proteínas de 100 kDa (carreras 1 y 2) y NopA64 (carreras 3 y 4) de poblaciones meristemáticas (carreras 1 y 3) y no meristemáticas (carreras 2 y 4) de la fracción insoluble de los núcleos. Los patrones de peso molecular se expresan en kilodaltons.

3. Determinación de las proteínas detectadas mediante la tinción Ag-NOR

Para detectar proteínas relacionadas con la Región del Organizador Nucleolar (NOR) y al mismo tiempo asociadas a la proliferación celular, se realizó la tinción AgNOR sobre membranas de PVDF de muestras meristemáticas y no meristemáticas de las fracciones solubles e insolubles de los núcleos. La tinción detectó una serie de bandas discretas que variaron en cuanto a número e intensidad de tinción en función del estado proliferativo de las células y de la fracción de la que se tratase.

Para la fracción S2 de muestras meristemáticas, las bandas más intensamente teñidas estuvieron a 120, 100, 45 y 43 kDa (figura 9, carrera 1), aunque existe una serie de bandas intermedias con menor intensidad de tinción. Para la muestra no meristemática de la fracción soluble (figura 9, carrera 2) estas proteínas se ven drásticamente reducidas, y las bandas intermedias prácticamente han desaparecido. El conjunto de los resultados obtenidos de la tinción AgNOR, la tinción por azul brillante de Coomassie y el *Western blot* con anticuerpo contra la proteína de 100 kDa pone de manifiesto que el nivel de la proteína de 100 kDa es considerablemente mayor en células meristemáticas que en no meristemáticas.

Para la fracción de la matriz nuclear de poblaciones meristemáticas se detectaron dos bandas mayoritarias, a 100 y 45 kDa respectivamente, y otras 5 bandas intermedias con menor intensidad de tinción (figura 9 carrera 3). En cambio, para la muestra de matriz nuclear de poblaciones no meristemáticas el patrón de tinción fue muy distinto, presentando una única banda mayoritaria, a 45 kDa, fuertemente reducida en comparación con las muestras meristemáticas, y una señal muy débil a 100 kDa, desapareciendo todas las bandas intermedias.

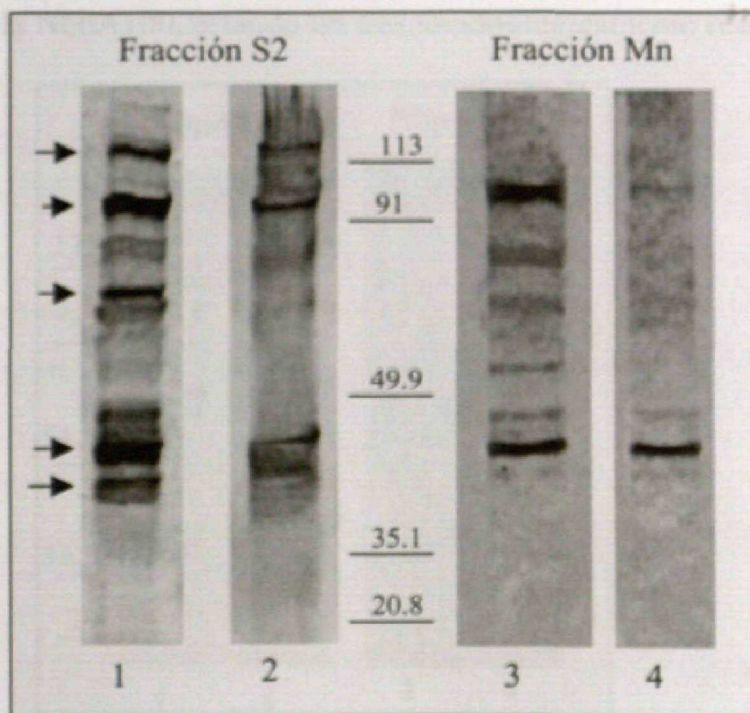


Figura 9.- Tinción AgNOR de muestras meristemáticas (carreras 1 y 3) y no meristemáticas (carreras 2 y 4) de la fracción S2 (carreras 1 y 2) y de la fracción de matriz nuclear (carreras 3 y 4). Las flechas indican las proteínas mayoritarias detectadas mediante esta tinción en la fracción soluble de los núcleos de muestras meristemáticas. La masa molecular se expresa en kDa.

4. Estudio de la fosforilación de la NopA100 y NopA64

La NopA100 es una proteína candidata a ser la homóloga de la nucleolina de mamíferos en cebolla. Esta proteína se sabe que está regulada, entre otros mecanismos, mediante la fosforilación. Para comprobar esta posibilidad en la NopA100 y NopA64 se realizó un tratamiento de desfosforilación mediante la incubación con fosfatasa alcalina sobre el extracto soluble de los núcleos de poblaciones meristemáticas. El *Western blotting* del control negativo de la NopA100, que siguió la misma incubación que la fracción tratada pero con la ausencia de la fosfatasa, muestra una banda mayoritaria a 100 kDa, al igual que el patrón descrito en condiciones normales, mientras que esta misma banda, en el *Western blotting* del extracto tratado, baja hasta los 95 kDa, mostrando el alto grado de fosforilación de la NopA100. El control negativo de la NopA64 (figura 10, carrera 3) muestra una banda mayoritaria a 61 kDa y la desaparición de la de 64 kDa, a la vez que al tratar con fosfatasa aparece una banda inferior a 60 kDa, lo que demuestra una sensibilidad de la NopA64 a las condiciones de incubación. No obstante, se aprecia una tercera banda en torno a 100 kDa, que sí parece estar afectada por el tratamiento, como se había descrito en apartados anteriores, y que se presume sea la NopA100, estando las dos inmunológicamente relacionadas.

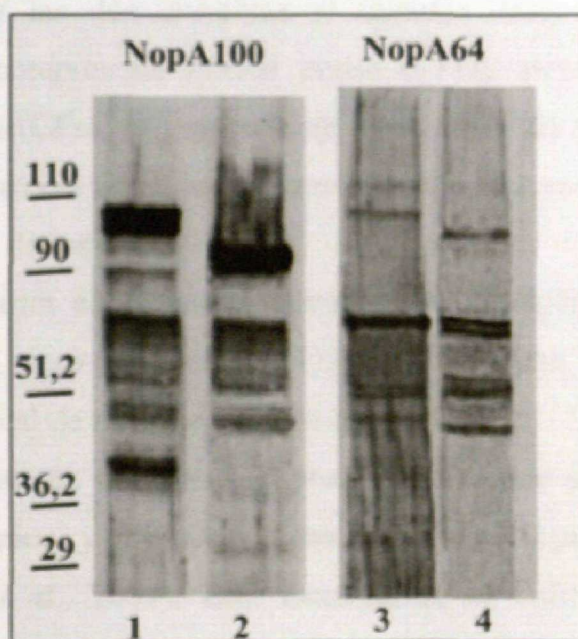


Figura 10.- Experimento de desfosforilación con fosfatasa alcalina. *Western blotting* con anticuerpo contra la NopA100 (carreras 1 y 2) y NopA64 (carreras 3 y 4) en la fracción soluble de los núcleos de poblaciones meristemáticas. Las carreras 1 y 3 son el control negativo del tratamiento, y las carreras 2 y 4 son los extractos tratados con la fosfatasa alcalina. Los pesos moleculares se expresan en kilodaltons.

5. Distribución intracelular de las proteínas

Para determinar la distribución intracelular de las proteínas NopA100 y NopA64 se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre cortes semifinos de células meristemáticas de la raíz. El uso de cortes semifinos presenta ventajas frente al uso de aplastados: las células están intactas, no deformadas, y se obtiene una alta resolución con gran calidad de imagen y muy buen enfoque sin recurrir al microscopio confocal. Esta técnica reveló la presencia de estas dos proteínas en el interior del núcleo y muy mayoritariamente en el nucleolo, siendo indetectable mediante esta técnica su presencia en el resto de la célula (figuras 11 y 12). Dentro del nucleolo, el patrón de distribución del marcado inmunofluorescente es heterogéneo, pero aparecen ligeras diferencias entre ambas proteínas. Mientras que la NopA64 se distribuye por casi todo el nucleolo, la NopA100 lo hace de manera más heterogénea, con zonas muy intensamente marcadas, y otras prácticamente sin marcar. Además, la proteína de 100 kDa también se ha detectado en nucleolos en profase y telofase (figura 12d).

Para conocer con precisión inequívoca la distribución subnucleolar de las proteínas, se procedió al marcaje con inmuno-oro y la observación al microscopio electrónico. Para las dos proteínas el marcaje observado se acumuló con mayor densidad en el componente fibrilar denso (CFD), siendo minoritario o nulo en los centros fibrilares (CFs), el componente granular (CG) y en las vacuolas nucleolares (figura 13). Dentro del CFD, los lugares más intensamente marcados correspondieron a las proximidades de los CFs.

Se realizaron controles negativos siguiendo todo el proceso en paralelo a la inmunodetección, pero omitiendo el anticuerpo primario. El resultado obtenido siempre fue la ausencia total de marcaje con oro coloidal.

La distribución de estas proteínas coincide con los lugares de transcripción de los genes ribosómicos y el procesamiento temprano del pre-rRNA (De Cárcer y Medina, 1999; Medina *et al.*, 2001). Esta localización es coherente con el papel funcional atribuido a estas proteínas.



Figura 11.- Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-NopA64 sobre cortes semifinos (b) de células interfásicas. La cromatina de los núcleos se encuentra teñida con DAPI (a). Aparece un marcaje nucleolar con distribución heterogénea. La barra de aumentos representa 10 µm.

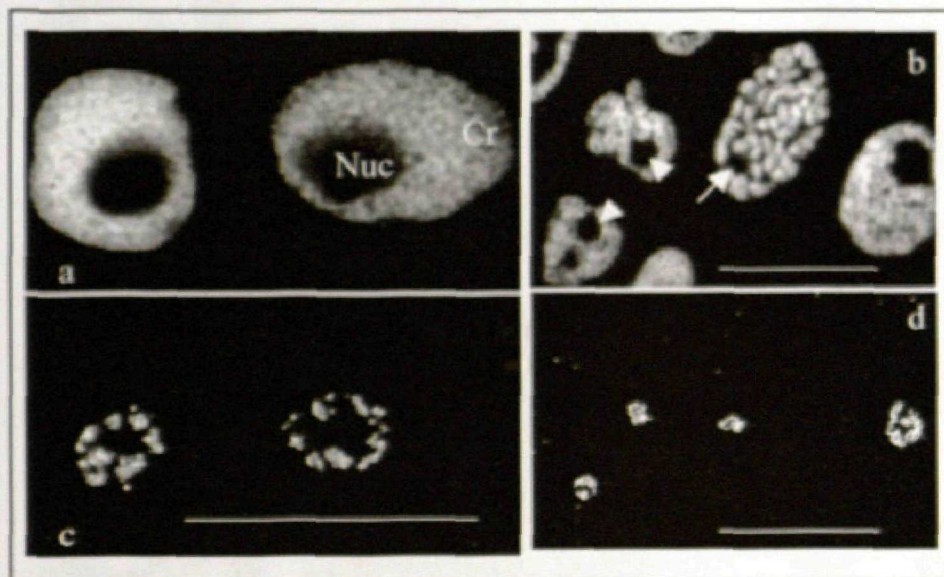


Figura 12.- Inmunofluorescencia con anticuerpo Anti-NopA100 sobre cortes semifinos (c y d). La distribución eminentemente nucleolar de la proteína aparece con claridad, al igual que su distribución heterogénea en el interior del nucleolo. El marcaje también está presente en nucleolos de núcleos en profase y telofase (b y d). Las cabezas de flecha indican los nucleolos de núcleos telofásicos y la flecha el nucleolo de un núcleo profásico. La cromatina se encuentra teñida con DAPI (a y b). La barra de aumentos representa 10 µm. Cr: cromatina. Nuc: nucleolo.

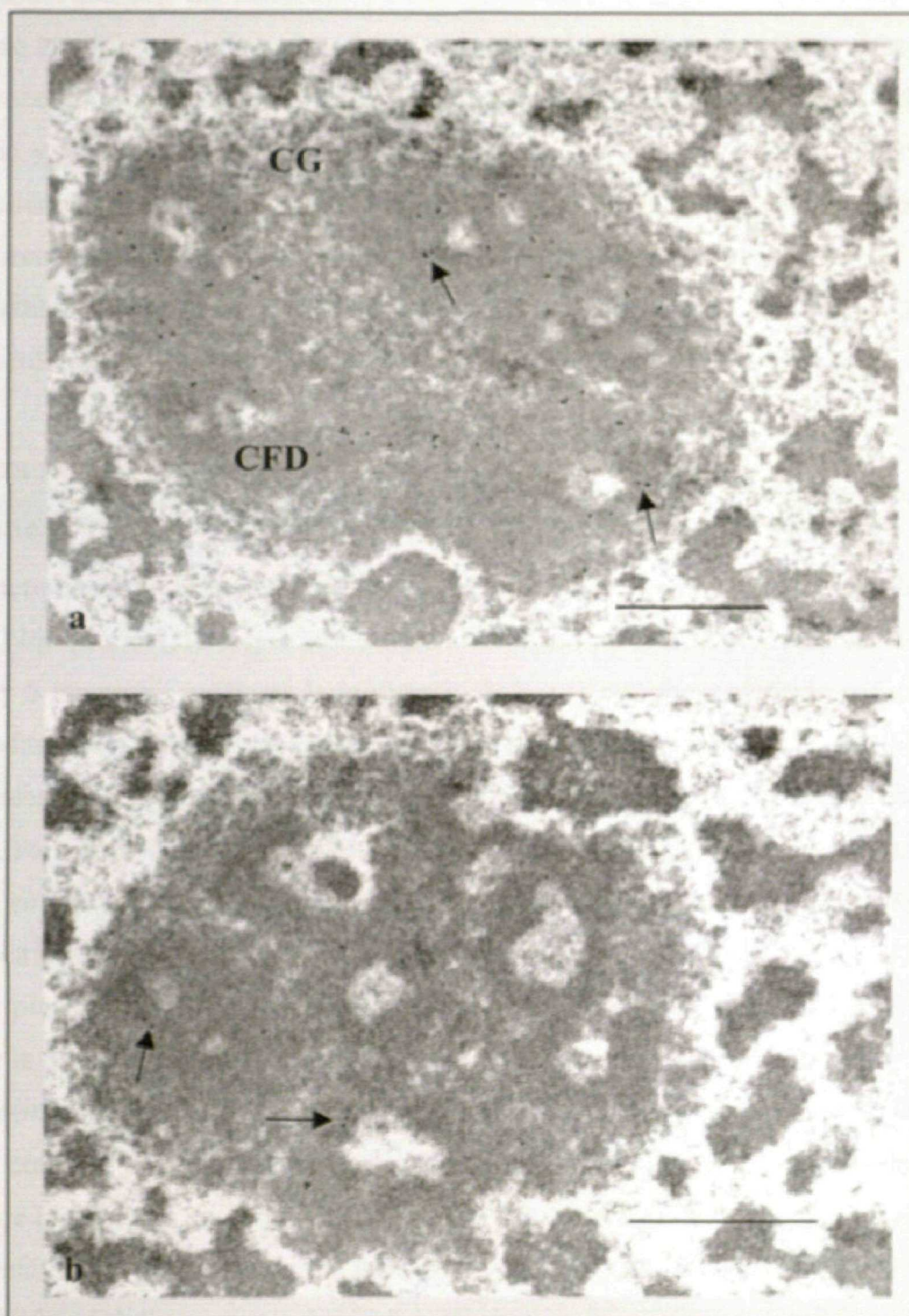


Figura 13.- Nucleolos de Allium cepa al microscopio electrónico de transmisión, con marcaje con anticuerpo anti-NopA100 y anti-NopA64 (a y b respectivamente), revelado con oro coloidal. El nivel de marcaje es ostensiblemente mayor para la NopA100, aunque el patrón de localización intranucleolar es esencialmente similar para las dos proteínas. Las partículas del marcado aparecen predominantemente en el componente fibrilar denso (CFD), mayoritariamente en torno a los centros fibrilares (flechas). La barra de aumentos representan 1 μ m. CG: Componente granular.

II.- ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Para poder estudiar las variaciones de las proteínas a lo largo de la interfase y la distribución de los diferentes componentes del nucleolo en las distintas etapas del ciclo celular, se procedió a la sincronización de las células meristemáticas. La calidad de la sincronización y la progresión de la población celular sincronizada a lo largo del ciclo celular se analizaron mediante citometría de flujo y con el cálculo del índice mitótico mediante el recuento del número de mitosis en cada momento de las tomas. Se analizaron mediante *Western blot* las variaciones de las proteínas NopA100 y NopA64 a lo largo de la interfase en las dos fracciones proteicas en estudio.

1. Sincronización de la población meristemática de la raíz. Cálculo del índice mitótico

La sincronización de la población celular se llevó a cabo mediante el tratamiento con la droga hidroxiurea (HU), que bloquea a las células en el punto de transición entre las fases G1 y S temprana mediante la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa (Young y Hodas, 1964). Tras el bloqueo se procedió a la recuperación de las células y a la toma de muestras a diferentes horas, que corresponden con puntos significativos del ciclo celular. Para comprobar la correspondencia entre los datos teóricos y la situación experimental se utilizó el análisis mediante citometría de flujo de las muestras tomadas a distintos tiempos de recuperación, para determinar la carga de DNA por núcleo en cada toma y poder observar la progresión de las células a través del ciclo celular, a excepción de la mitosis (figura 14).

El control (figura 14a) fue realizado mediante el análisis de 20 raíces no tratadas y por tanto, con sus poblaciones celulares asincrónicas. El histograma representa la distribución de los núcleos en la interfase del ciclo celular, según su carga de DNA, y la abundancia relativa de cada uno de los períodos de la interfase. Los valores obtenidos fueron, para la fase G1-S temprano, del $57,5 \pm 3\%$, para la fase S del $17,4 \pm 5,7\%$ y para la fase G2 del $16,1 \pm 6,1\%$.

Cuando las raíces fueron tratadas con HU, la mayoría de las células (77%) fueron detenidas en la transición G1-S, correspondiendo con las 0 horas de recuperación tras la liberación de la droga. La figura 14c muestra el movimiento de la población celular de G1 a G2, pasando por la fase S, mediante el análisis de las muestras tomadas

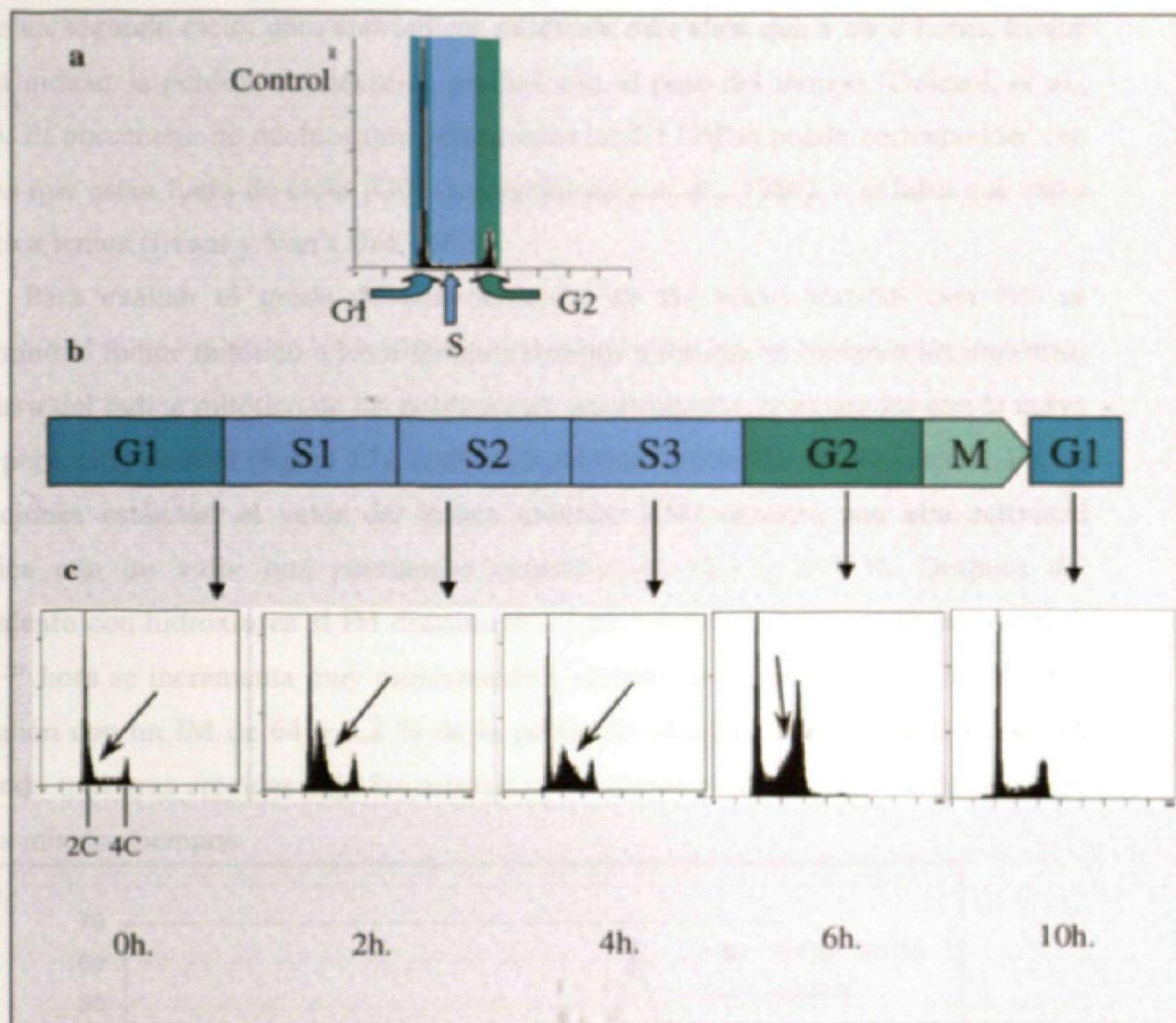


Figura 14.- Sincronización de las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa*. (a) Diagrama de citometría de flujo representando la cantidad de DNA (abscisas) y número de núcleos (ordenadas) en la interfase de una población control (no sincronizada). El primer pico de la gráfica corresponde con el período G1, el segundo con el G2 y la región central corresponde a la fase S. (b) Esquema de las diferentes fases y subperíodos del ciclo celular sujeto a estudio. (c) Gráficas obtenidas mediante el análisis por citometría de flujo de los núcleos provenientes de tomas realizadas a distintos tiempos tras la recuperación del tratamiento con la hidroxiaurea. 2C y 4C indican la cantidad de DNA presente en cada núcleo durante el ciclo siendo C la cantidad de DNA que posee una célula haploide antes de la duplicación del DNA (n cromátidas). Las flechas indican la situación, dentro de la interfase, de la población sincronizada en el momento de cada toma.

entre 0 y 6 horas después de la liberación del bloqueo. La fase G2 se localiza entre las 6 y 7 horas, punto éste último en el que se observó el comienzo de la mitosis. A las 10 horas la mayoría de la población celular meristemática se localizó de nuevo en la fase G1 de un segundo ciclo, pero con índices mitóticos más altos que a las 0 horas, lo que podría indicar la pérdida de sincronía gradual con el paso del tiempo (Dolezel, *et al.*, 1999). El porcentaje de núcleos que permanecen en G1 (10%) puede corresponder con células que están fuera de ciclo (G0) (Darzynkiewicz *et al.*, 1980), o células que están en ciclos lentos (Evans y Van't Hof, 1975).

Para evaluar el grado de sincronización de las raíces tratadas con HU se determinó el índice mitótico a los diferentes tiempos a los que se tomaron las muestras. La curva del índice mitótico de las poblaciones sincronizadas, comparadas con la curva de la población control (figura 15), confirman un buen grado de sincronización. En las condiciones estándar, el valor del índice mitótico (IM) muestra una alta actividad mitótica con un valor que permanece constante de $11,7 \pm 0,7 \%$. Después del tratamiento con hidroxiiurea el IM disminuyó a $1,01 \pm 0,5 \%$ hasta las 6 horas. A partir de la 7ª hora se incrementa muy rápidamente y alcanza un máximo a las 8 horas de la liberación con un IM de $64 \pm 3,2 \%$ de la población (figura 16). El control se realizó contando muestras crecidas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de la droga, y a los mismos tiempos.

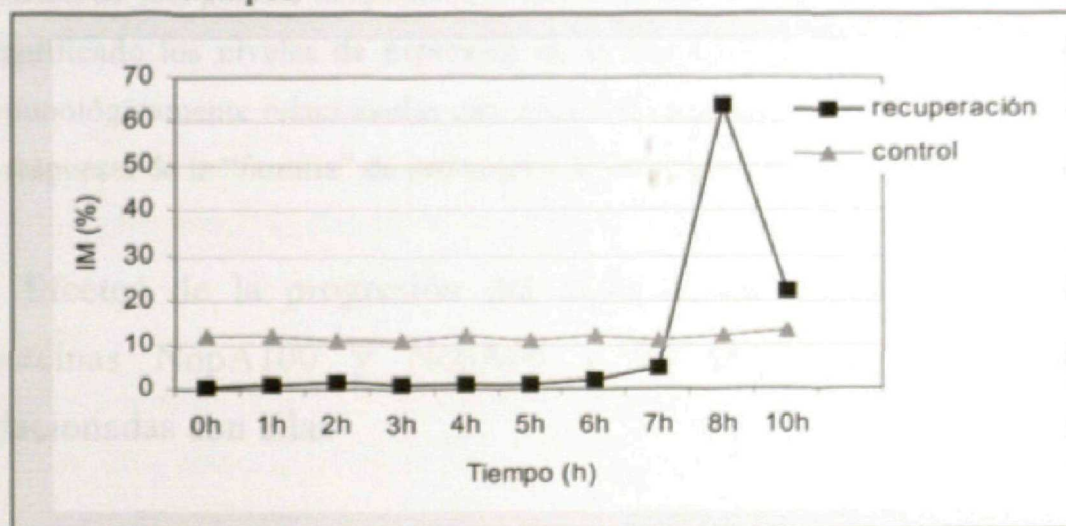


Figura 15.- Representación gráfica del cálculo del índice mitótico. En abscisas se muestran los tiempos a los que se realizó el conteo de las muestras a partir de la eliminación de la hidroxiiurea, y en ordenadas el porcentaje de mitosis que se contó en cada una de las muestras, es decir, el índice mitótico. Las gráficas representan el número de mitosis en cada una de las horas analizadas. La línea de cuadrados corresponde con la población sincronizada mediante el tratamiento con hidroxiiurea y recuperada en medio libre de la droga. La línea de triángulos representa el número de mitosis de una población control sin tratamiento, pero tomando muestras a los mismos tiempos que las poblaciones tratadas.



Figura 16.- Imagen de microscopía de fluorescencia de la población celular correspondiente a 8 horas de recuperación después del tratamiento con la hidroxiurea. La muestra fue teñida con DAPI. Obsérvese la gran cantidad de figuras mitóticas.

III.- ESTUDIO DE LA MADURACIÓN PROTEOLÍTICA DE LA NopA100

Como se ha descrito en un apartado anterior, el anticuerpo anti-NopA100 revela una familia de proteínas inmunológicamente relacionadas, la mayoría de ellas de peso molecular menor que 100 kDa. La aparición de estas bandas podría ser la consecuencia de un proceso de maduración proteolítica de la proteína mayoritaria. También, perteneciente a esta familia, se encuentra una proteína de mayor peso molecular, que podría corresponder con el precursor de la proteína de 100 kDa.

Con objeto de clarificar este problema con la mayor precisión y de definir la relación de esta posible modulación proteolítica con el progreso del ciclo celular, hemos cuantificado los niveles de expresión de la NopA100 y NopA64, y de las proteínas inmunológicamente relacionadas con ellas a lo largo de la interfase, y hemos estudiado la respuesta de la "familia" de proteínas a la incubación con un inhibidor de proteasas.

1. Efectos de la progresión del ciclo celular sobre los niveles de las proteínas NopA100 y NopA64 y las proteínas inmunológicamente relacionadas con ellas

1.1- En la fracción soluble de los núcleos

Para este estudio se incubaron con el anticuerpo contra la NopA100 extractos de la fracción proteica soluble de los núcleos sincronizados a los distintos tiempos (0 horas para G1, 2 y 4 horas para S y 6 horas para G2) y se analizaron por *Western blotting* (figura 17a). Los valores de la intensidad de las proteínas se normalizaron y se analizaron densitométricamente. El ensayo fue realizado partiendo de las proteínas

obtenidas a partir del mismo número de núcleos. El control se llevó a cabo con raíces crecidas en las mismas condiciones pero sin ser sometidas al tratamiento con la droga, por lo que la población meristemática era asincrónica respecto del ciclo celular.

Se observó un aumento progresivo, tanto de la cantidad de proteína de 100 kDa, correspondiente a la NopA100, como de las demás bandas (figura 17b y c). La densidad de bandas por debajo de NopA100 se acentuó intensamente en G2, llegando a apreciarse una nueva banda (36 kDa). La cuantificación de estos cambios nos muestra un aumento progresivo en la cantidad de proteína NopA100 a lo largo de la interfase, alcanzando su cota superior a las 6 horas (G2). El resto de las proteínas aumentan progresivamente a lo largo del ciclo, de 0 horas (G1) a 2 horas las diferencias no son significativas, mientras que de 2 a 4 son altamente significativas (***) al igual que sucede de 4 a 6 horas. Estos aumentos muestran la importancia cuantitativa de la proteína NopA100 en núcleos con alta actividad, así como de las proteínas que son reveladas por su anticuerpo específico.

El análisis mediante *Western blotting* de la NopA64 a lo largo de la interfase muestra constantemente el mismo patrón de reacción inmunológica que el descrito genéricamente para las células meristemáticas asincrónicas, con dos bandas principales, una mayoritaria a 64 kDa y otra minoritaria a 61 kDa, pero también se observa una tercera banda, a 100 kDa (figura 18). El estudio densitométrico en poblaciones celulares sincrónicas indica la existencia de un aumento progresivo de la proteína entre G1 y G2 (figura 18b). La banda responsable del aumento mayoritario de la proteína es la de 64 kDa, mientras que las diferencias de la banda de 61 kDa no son significativas. El control se llevó a cabo como en el caso anterior.

Comparando la evolución de ambas proteínas observamos que en ambos casos se produce un aumento entre G1 y S, aunque en el caso de la NopA100 lo hace en una proporción mayor; también en ambos casos, los niveles máximos de cantidad de proteína se alcanzan en G2. Tanto para el caso de la NopA64 como de la NopA100, la cantidad de proteína presente en G2 es casi el doble de la que hay en G1 (figura 19).

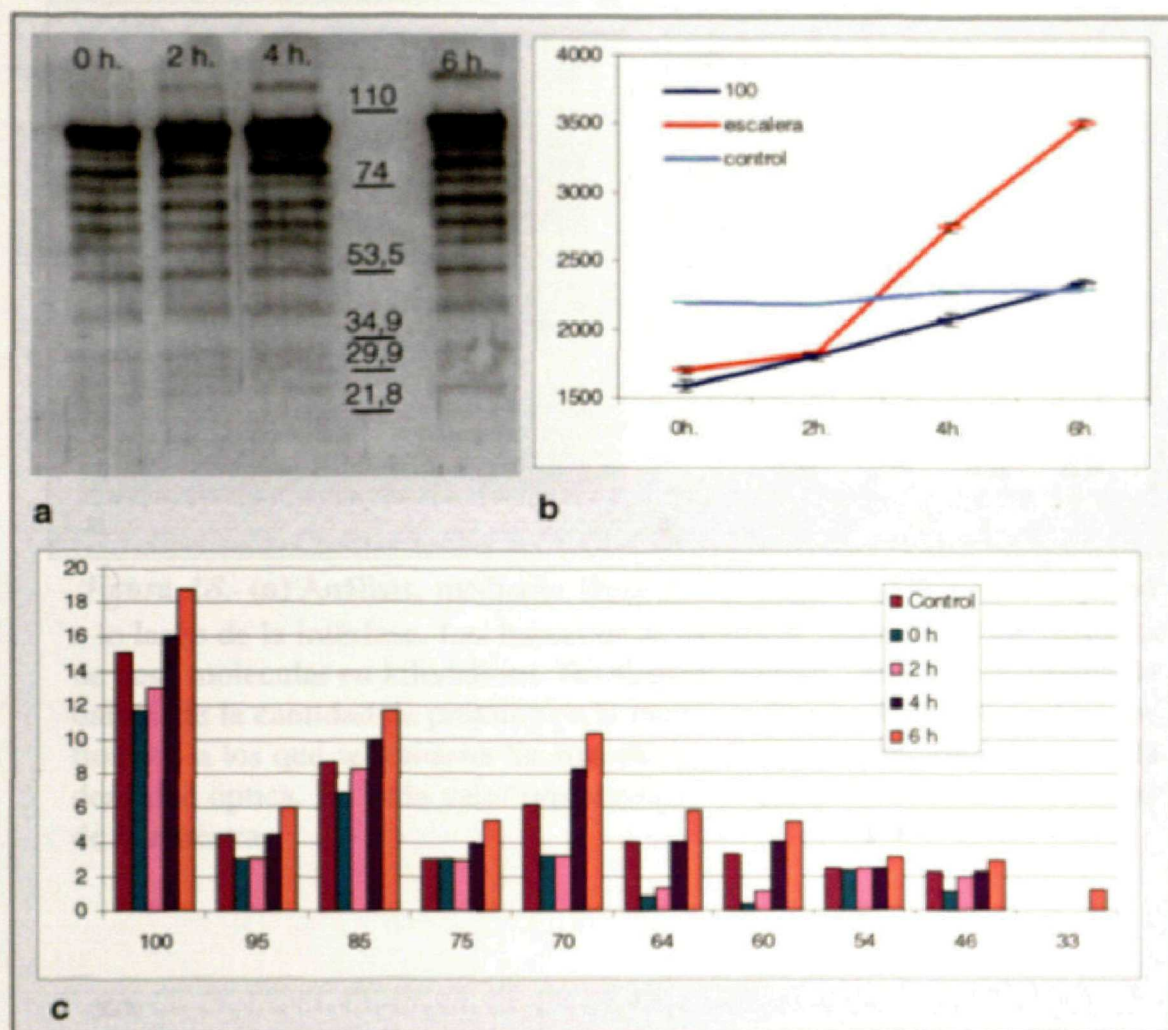


Figura 17.- Cuantificación de la proteína NopA100 y de las proteínas inmunológicamente relacionadas con ella en células sincrónicas. **(a)** Detección, mediante *Western blotting*, de las proteínas de la fracción soluble de los núcleos incubados con anticuerpo contra la proteína de 100 kDa, de muestras tomadas a las distintas horas después del tratamiento con hidroxiquina. Los pesos moleculares se expresan en kilodaltons. **(b)** Representación gráfica de las variaciones de las proteínas. En azul se muestra el análisis correspondiente a la banda de 100 kDa, con un aumento progresivo a lo largo de la interfase con un pico en G2. En rojo, la escalera de bandas detectadas, por reacción cruzada, por debajo de la banda de 100 kDa; aumentan progresivamente a lo largo de la fase S y drásticamente en G2. En morado el control (población asincrónica). Para cada uno de los valores se representa la desviación estándar de la muestra. En abscisas se representan los tiempos de recuperación a los que se tomaron las muestras tras el tratamiento con hidroxiquina, en ordenadas los valores de la densidad óptica. **(c)** Diagrama de barras de la evolución de cada banda detectada a las diferentes horas.

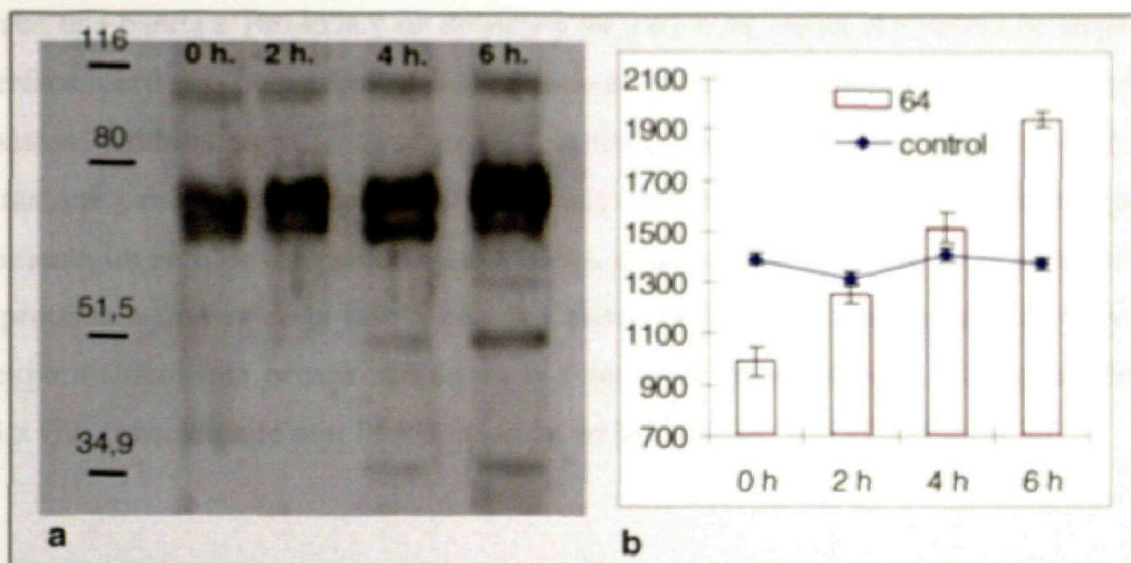


Figura 18.- (a) Análisis, mediante *Western blotting*, de la proteína NopA64 a lo largo de la interfase. Las barras de la izquierda representan los patrones de peso molecular en kilodaltons. **(b)** Representación, mediante diagrama de barras, de la cantidad de proteína en la interfase. En abscisas se muestran los tiempos a los que se tomaron las muestras, y en ordenadas los valores de la densidad óptica. En cada valor representado se añade la desviación estándar de la muestra.

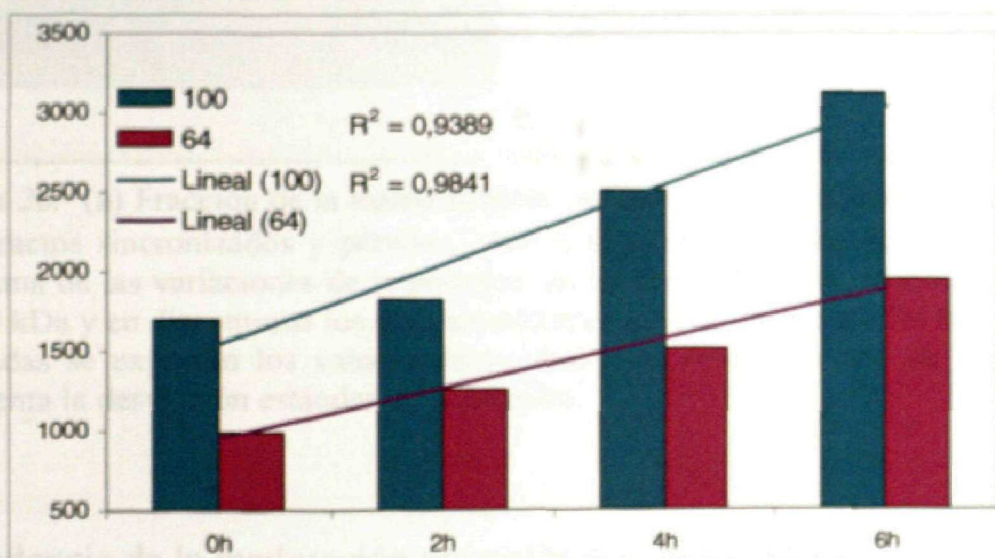


Figura 19.- Representación en diagrama de barras de los niveles de las dos proteínas, NopA100 y NopA64 en los distintos tiempos a los que se tomaron muestras tras la sincronización con la hidroxiurea. En verde, la NopA100, muestra una línea de tendencia más acusada que la correspondiente a la NopA64 (morada).

1.2- En la fracción insoluble de los núcleos

El anticuerpo contra la NopA100, que, como se vio en apartados anteriores, mostraba una banda a 100 kDa y un doblete a 64 y 61 kDa, repite el patrón a lo largo de la interfase, pero con pequeñas modificaciones en cuanto a la intensidad de las bandas. No existen cambios significativos entre 0 horas, 2 horas y 4 horas para el doblete, mientras que para la banda de 100 kDa, no hay cambios entre 0 horas y 2 horas, pero experimenta un pico de intensidad a las 4 horas, indicando un aumento en la producción de la proteína a finales de la fase S con una nueva caída en G2. Las bandas de 64 y 61 kDa experimentan una brusca subida en la intensidad de sus niveles, de finales de la fase S a G2, coincidiendo con la disminución de la banda de 100 kDa (figura 20).

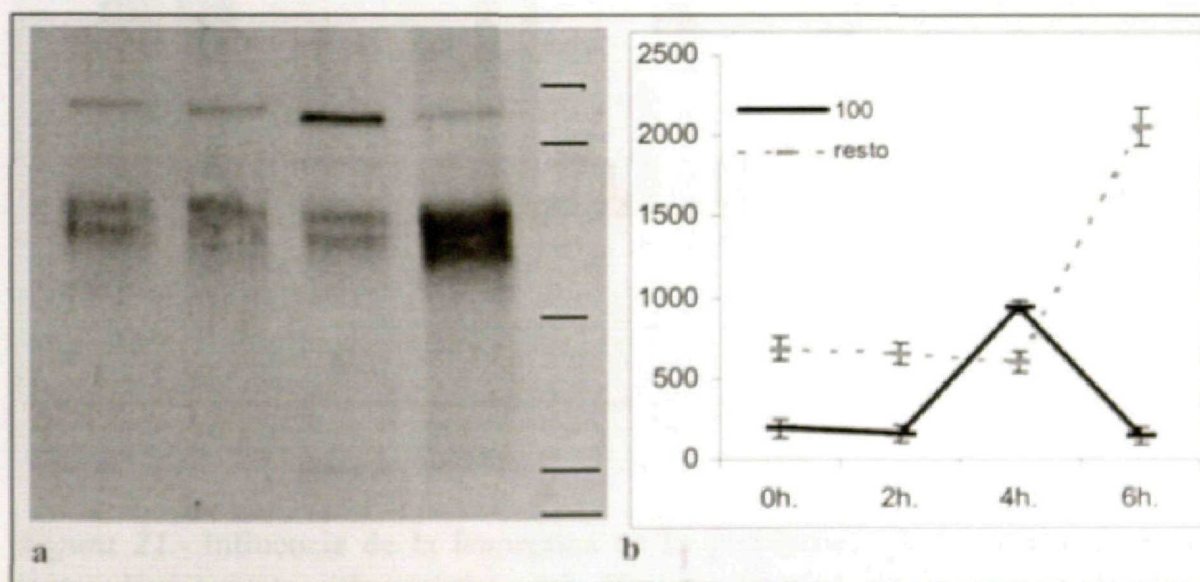


Figura 20.- (a) Fracción de la matriz nuclear incubada con el anticuerpo anti-NopA100 en extractos sincronizados y pertenecientes a diferentes tiempos de recuperación. **(b)** Diagrama de las variaciones de la proteína, en línea continua los valores de la proteína de 100 kDa y en discontinua los correspondientes a las otras dos bandas en conjunto. En ordenadas se expresan los valores densitométricos. Para cada uno de los valores se representa la desviación estándar de la muestra.

2. Evidencia de la maduración proteolítica de la NopA100

Para comprobar si, efectivamente, la aparición de la familia de proteínas inmunológicamente relacionadas con la NopA100 es debida a la degradación proteolítica de ésta, los núcleos aislados fueron incubados en presencia de un inhibidor de proteasas general, la leupeptina, a una concentración de $10 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El patrón de la muestra incubada con el inhibidor de proteasas mostró importantes variaciones respecto al general, disminuyendo la abundancia de algunas proteínas del extracto (95 kDa, 64 kDa, 60 kDa, 54 kDa, 46 kDa). Una de las bandas, la de 75 kDa, desaparece, mientras que las bandas de 100 kDa, 85 kDa y 70 kDa se ven incrementadas, produciéndose una acumulación de estas tres bandas en detrimento de las restantes (figura 21).

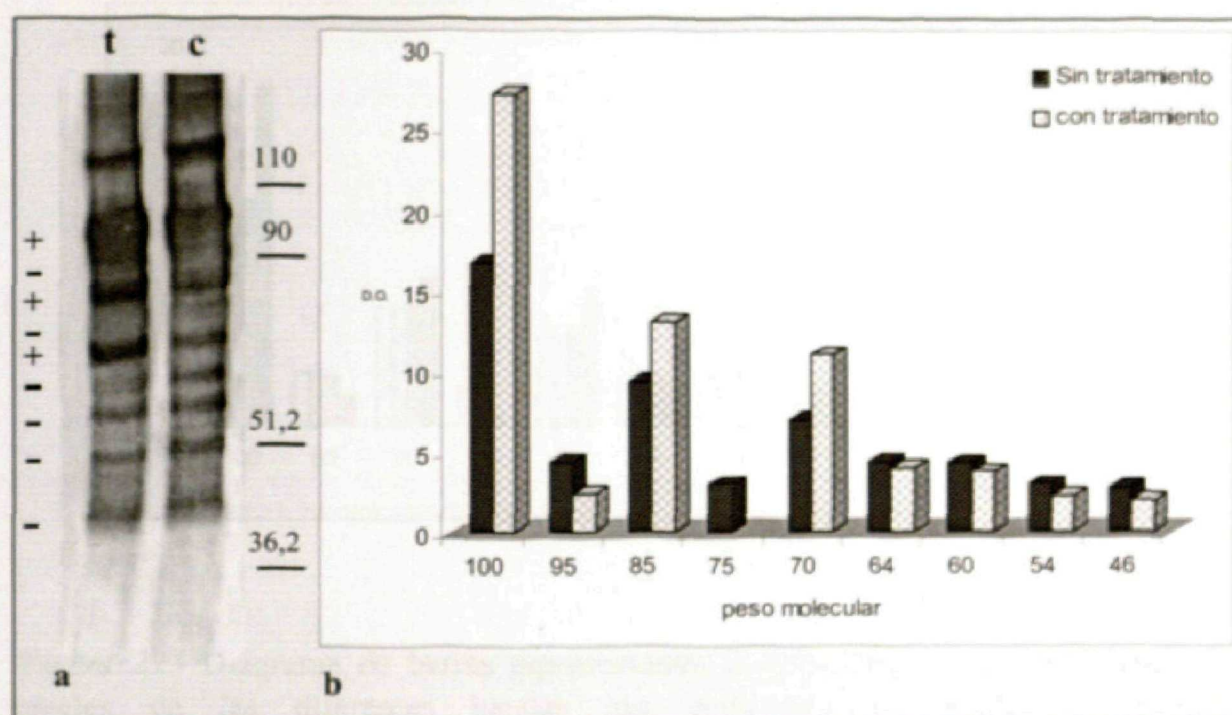


Figura 21.- Influencia de la leupeptina en la distribución de la familia de proteínas inmunológicamente relacionadas. **(a)** *Western blotting* de proteínas tratadas con leupeptina (carrera t), y proteínas control, sin tratamiento (carrera c). Las barras de la derecha indican el peso molecular en kilodaltons correspondiente a los patrones de peso molecular. Los símbolos de la izquierda indican incremento de la banda en la muestra tratada con respecto al control (+) o bien descenso (-). **(b)** Representación en diagrama de barras de las variaciones de las bandas entre las proteínas tratadas y las control. En abscisas se muestran los pesos moleculares correspondientes a cada banda expresado en kilodaltons, y en ordenadas los valores relativos de la densidad óptica. Se observa un aumento en las bandas de 100, 85 y 70 kDa a expensas de la disminución de todas las demás, una de las cuales (75 kDa) llega a desaparecer.

3. Análisis de la maduración proteolítica durante el ciclo celular

Para comprobar las variaciones en la proteólisis de NopA100 en las distintas etapas del ciclo celular, se procedió a la incubación de núcleos sincronizados con el inhibidor de proteasas leupeptina a diferentes tiempos de toma de muestras. En la fase G1 no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de las diferentes bandas

en las muestras con proteólisis inhibida y los controles, salvo la banda de 75 kDa que se vio disminuida en la muestra incubada con leupeptina. Con respecto a S, tampoco se apreciaron grandes cambios, aunque sí una tendencia a la disminución de todas las bandas a excepción de las de 100, 85 y 75 kDa. Esta tendencia se confirma con muestras pertenecientes a G2, donde la acumulación en 100 kDa es muy acusada (figura 22).

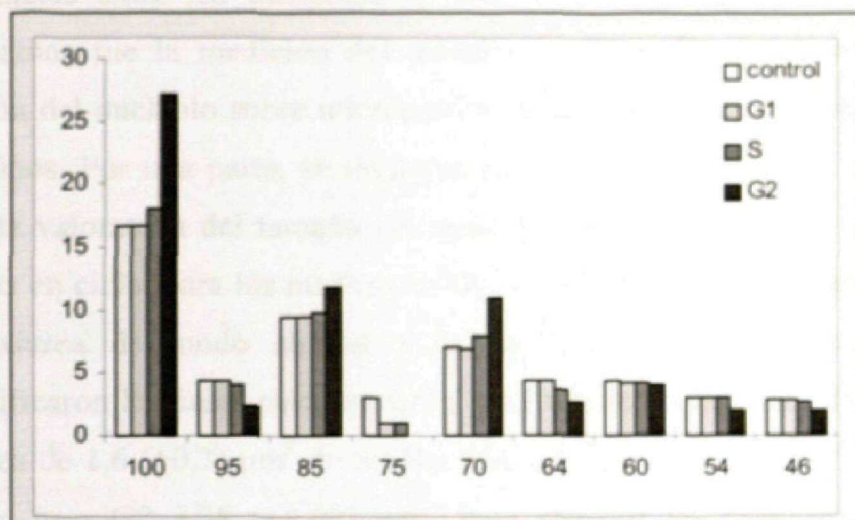


Figura 22.- Diagrama de barras representando la influencia de la leupeptina en los niveles de las diferentes bandas que componen la familia de proteínas inmunológicamente relacionadas con la NopA100, a lo largo de la interfase. En abscisas se muestran los pesos moleculares correspondientes a cada banda expresados en kilodaltons, y en ordenadas los valores relativos de la densidad óptica.

IV.- ORGANIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS NUCLEOLOS EN LA INTERFASE Y DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS NopA100 Y NopA64

Se sabe desde hace mucho tiempo que existen diferencias en la morfología de los nucleolos en las distintas etapas de la interfase. Estas diferencias morfológicas responden a los estados de actividad nucleolar, siendo mucho mayor el nucleolo en G2 que en G1. En general, los nucleolos en la fase G1, además de ser más pequeños que en G2, contienen pocos pero grandes CFs y el CG es escaso y periférico. Por el contrario, en G2, el número de CFs aumenta pero disminuyen en tamaño y el CG mantiene una gran presencia y se localiza entremezclado con el CFD. Pretendemos cuantificar estas

diferencias en *Allium cepa* y establecer el patrón de variaciones de cada componente morfológico a lo largo de la interfase.

1. Cuantificación del tamaño de los nucleolos en las distintas etapas de la interfase

Para atribuir rangos a parámetros objetivos que nos permitan establecer las diferencias entre los nucleolos en distintas etapas de la interfase, lo primero que realizamos fue la medición del tamaño de éstos. En concreto, se midió el área en sección del nucleolo sobre micrografías obtenidas al microscopio electrónico de cortes ultrafinos. Por una parte, se midieron nucleolos pertenecientes a células diferenciadas para la valoración del tamaño del nucleolo en células paradas en G0; respecto de las células en ciclo, para los núcleos en G1, S y G2 se tomaron muestras sincronizadas con hidroxiaurea de modo similar a las utilizadas en las secciones precedentes. Se cuantificaron las áreas pertenecientes a 15 muestras para cada fase. Para G0 se obtuvo un área de $1,6 (\pm 0,3) \mu\text{m}^2$ de media, para G1 $2,311 (\pm 0,48) \mu\text{m}^2$, para S de $2,28 (\pm 3,8) \mu\text{m}^2$ y para G2 $3,38 (\pm 0,69) \mu\text{m}^2$. Para analizar las diferencias entre los nucleolos pertenecientes a las distintas fases se realizó una prueba T de Student. Las diferencias encontradas entre G0 y G1 fueron altamente significativas, entre G1 y S no se encontraron diferencias y entre S y G2 también fueron altamente significativas (figura 23).

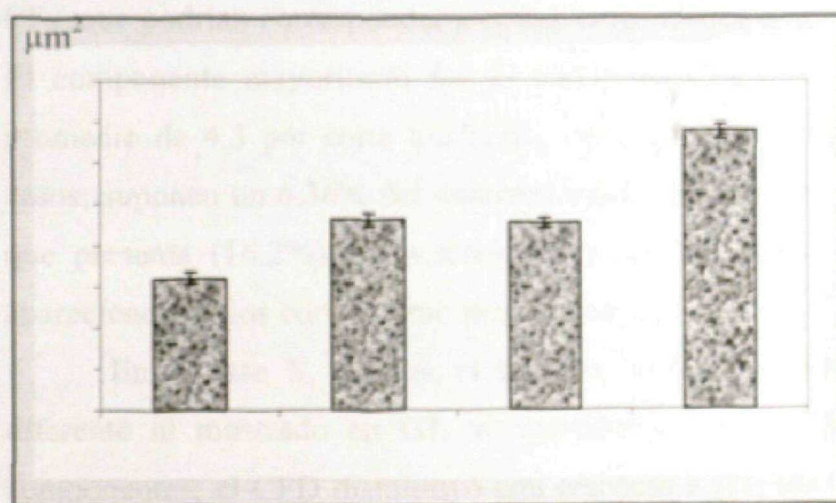


Figura 23.- Diagrama de barras en el que se muestran los tamaños medios de los nucleolos en las diferentes etapas de la interfase, el error estándar de la media y el grado de significación de las diferencias entre etapas. En abscisas se expresan las etapas de la interfase, en ordenadas las áreas en μm^2 .

2. Distribución de los componentes subnucleolares en las diferentes etapas de la interfase

Para conocer la dinámica de los componentes que forman el nucleolo a lo largo de la interfase y su importancia cuantitativa, éstos se analizaron partiendo de las 15 muestras por fase que sirvieron para analizar las variaciones en cuanto al tamaño, midiendo las micrografías obtenidas al microscopio electrónico de cortes ultrafinos, utilizando el programa "Leica QWin". Las mediciones se analizaron sobre cortes centrales de los nucleolos, en los que el tamaño estaba próximo a las medidas obtenidas en la sección precedente.

Los nucleolos en fase G0 estaban compuestos por CFD en más de un 85%, mientras que el CG estaba prácticamente ausente. Los CFs son grandes, heterogéneos y en número muy bajo; por esta razón están ausentes en un apreciable número de cortes (figura 24a).

Los nucleolos en fase G1 presentaron dos modelos estructurales, uno con una vacuola central prominente (figura 25c) y otro sin vacuola (figura 25b). Puede ocurrir que el modelo sin vacuola corresponda en realidad, a cortes de nucleolos vacuolados a un nivel que no comprenda la vacuola. Además, en algunos casos puede observarse otro tipo de vacuolas, en un número bajo (1,25 por nucleolo como media) y asociadas a los CFs, que podrían corresponder a cortes tangenciales o ramificados de la vacuola mayor. El componente mayoritario fue el CFD; los CFs que presentan son pocos, con un promedio de 4,3 por corte nucleolar, pero grandes y heterogéneos en un 87% de los casos; suponen un 6,36% del volumen total del nucleolo (figura 24a y b). El escaso CG que presenta (16,2%) se localizó, en todos los casos, en la periferia del nucleolo, apareciendo en los cortes como una fina capa.

En la fase S, aunque el tamaño de los nucleolos no fue significativamente diferente al mostrado en G1, sí aparecieron importantes cambios en cuanto a sus componentes; el CFD disminuyó con respecto a G1, los CFs disminuyeron en tamaño, aunque el número no cambió sustancialmente, y las vacuolas existentes de pequeño tamaño se encontraron asociadas a CFs, sin presencia de vacuola central. El CG aumentó, pero con una distribución muy característica, en la periferia del nucleolo (figura 26a y figura 24c).

En el caso de nucleolos en fase G2 también se han descrito dos modelos, en los que la presencia de una gran vacuola central vuelve a ser carácter determinante (figura 26b y c). En este caso se puede descartar que la ausencia de vacuola se deba al nivel de corte, puesto que la organización estructural es diferente. Es plausible, sin embargo, que el nucleolo vacuolado se origine por reorganización del modelo sin vacuolar, o a partir de él. En ambos casos, el CG pasó a ser el mayoritario en detrimento del CFD y se encontró entremezclado con éste por todo el nucleolo. El porcentaje de los CFs respecto al volumen total del nucleolo fue muy similar en ambos casos (2,4 y 2,5), presentando una media de 13 CFs por nucleolo, de pequeño tamaño; de éstos, el 0,12% son heterogéneos. En los dos modelos se encontró ocasionalmente otro segundo tipo de vacuola, pequeña y asociada a los CFs.

Tanto G1 como G2 han mostrado dos organizaciones estructurales basadas en la presencia o no de vacuola central. En ambos casos, el modelo descrito sin vacuola fue el mayoritario y supone un 78% para G1 y un 80% para G2. Además de esta vacuola central, se muestra otro tipo de vacuola, pequeña y asociada a los CFs.

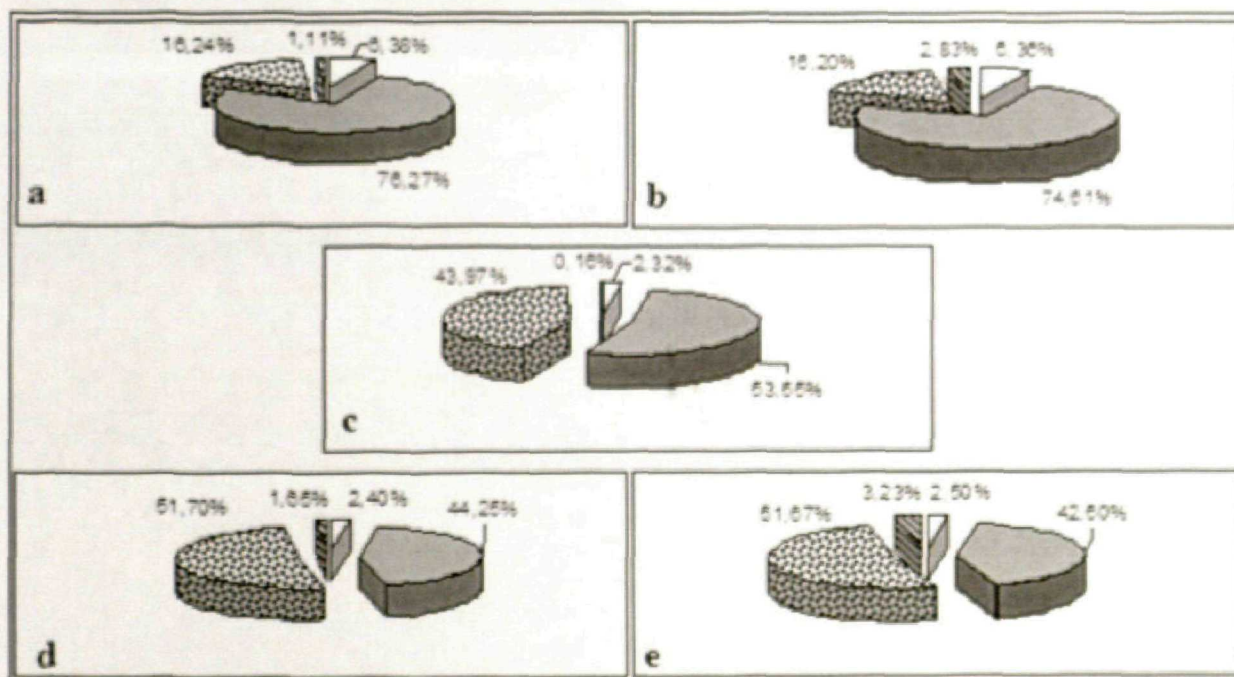


Figura 24.- Representación gráfica de los valores porcentuales correspondientes a los diferentes subcomponentes nucleolares en los periodos de la interfase. **(a)** nucleolo en G1 modelo 1; **(b)** nucleolo en G1 modelo 2; **(c)** en fase S; **(d)** nucleolo en G2 perteneciente al modelo 1; **(e)** nucleolo en G2 modelo 2. La trama de puntos corresponde al CG, el color gris al CFD, el blanco a los CFs y la trama rayada a las vacuolas.

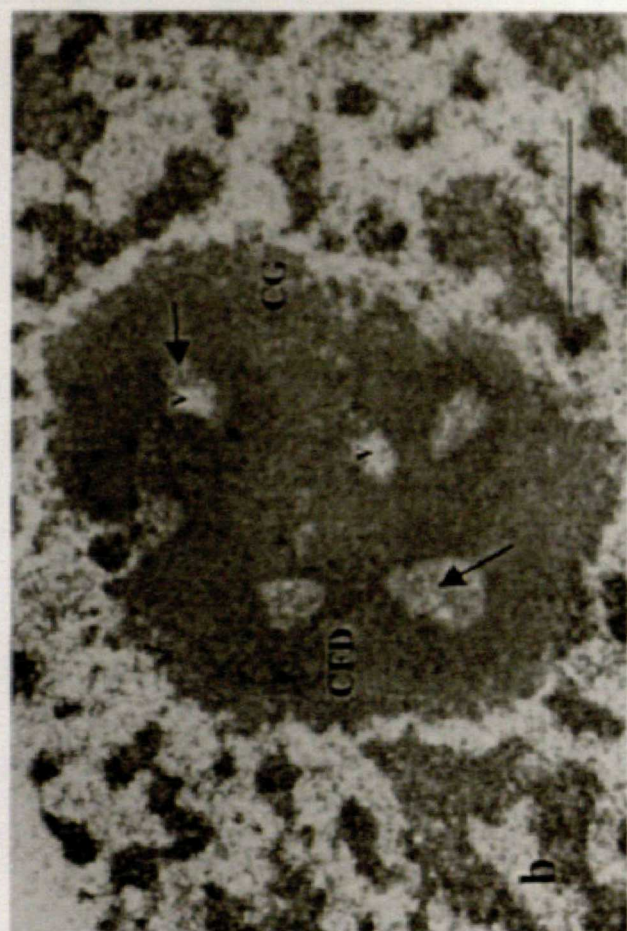
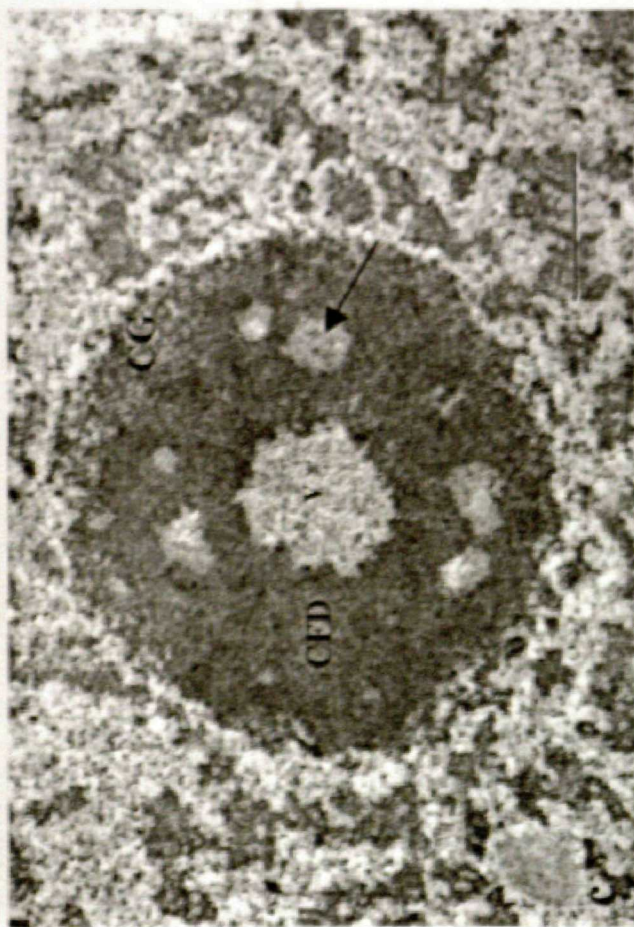
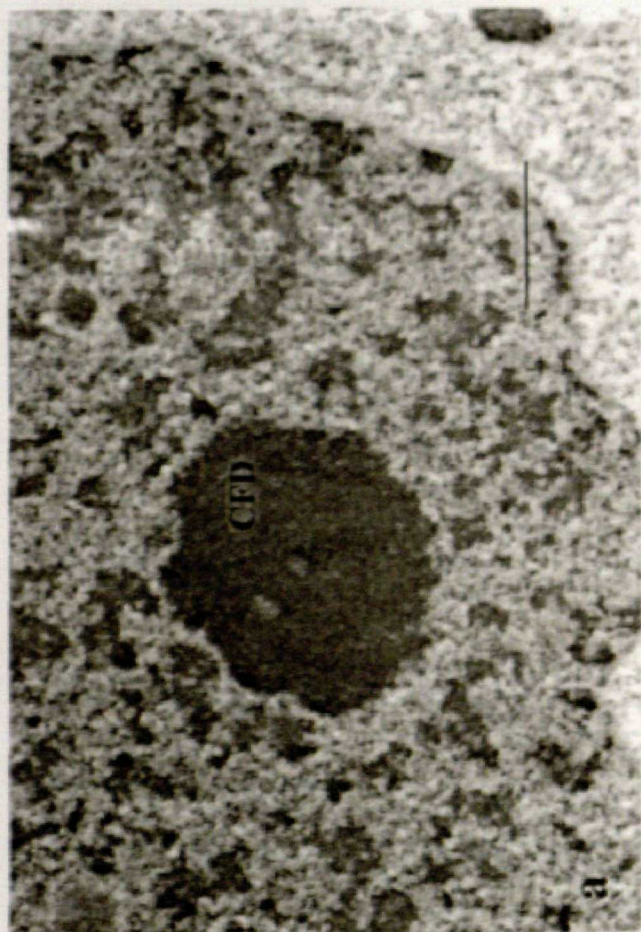


Figura 25.- Subcomponentes nucleolares en las distintas etapas de la interfase. (a) Nucleolo perteneciente a una célula en fase G0. (b) Nucleolo en fase G1, modelo 1. (c) Nucleolo en fase G1 modelo 2. CFD: Componente Fibrilar Denso. Las flechas indican Centros Fibrilares. CG: Componente Granular. V: Vacuola. La barra de aumentos representa 1µm.

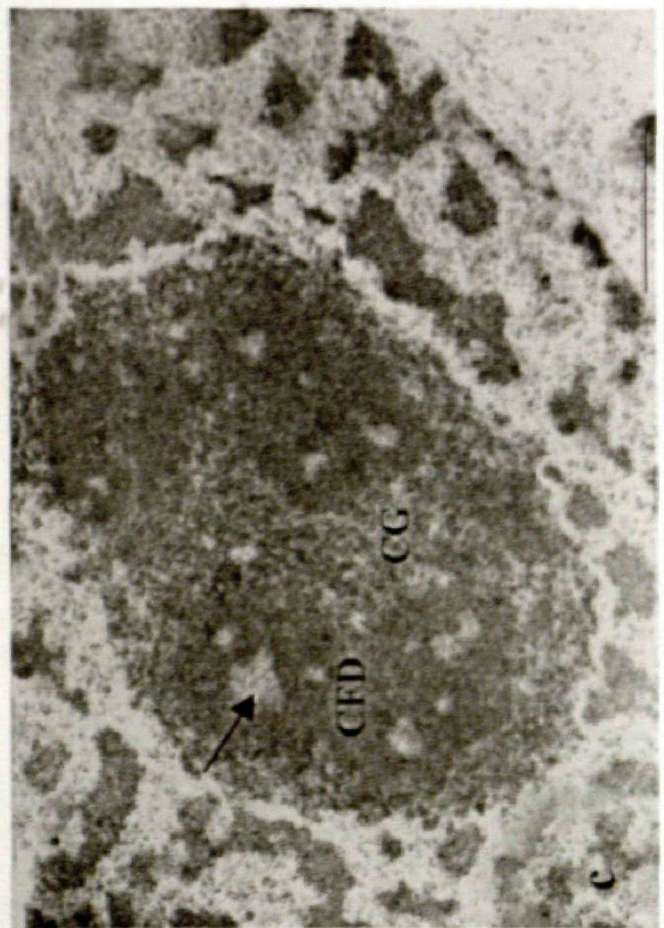
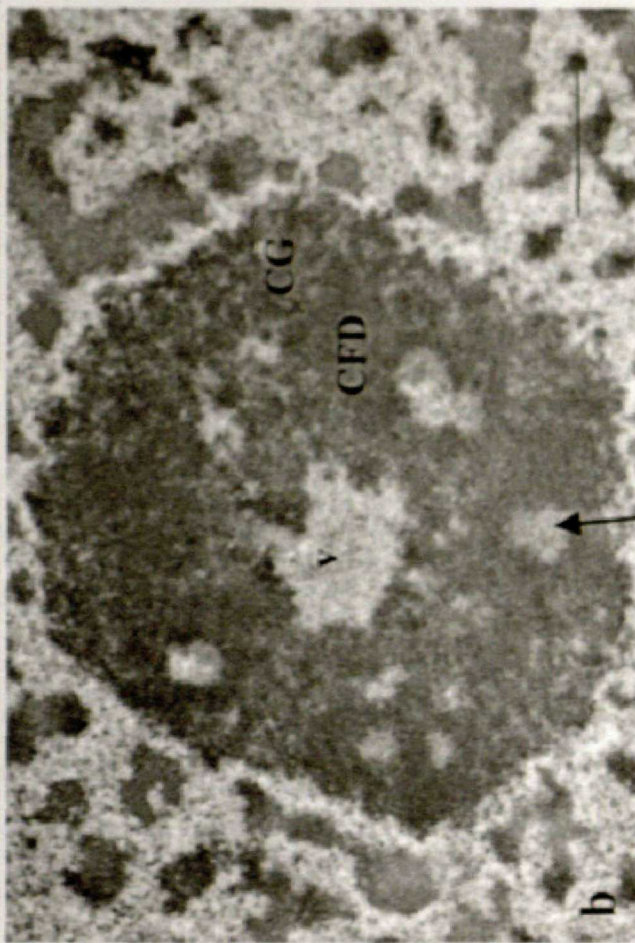
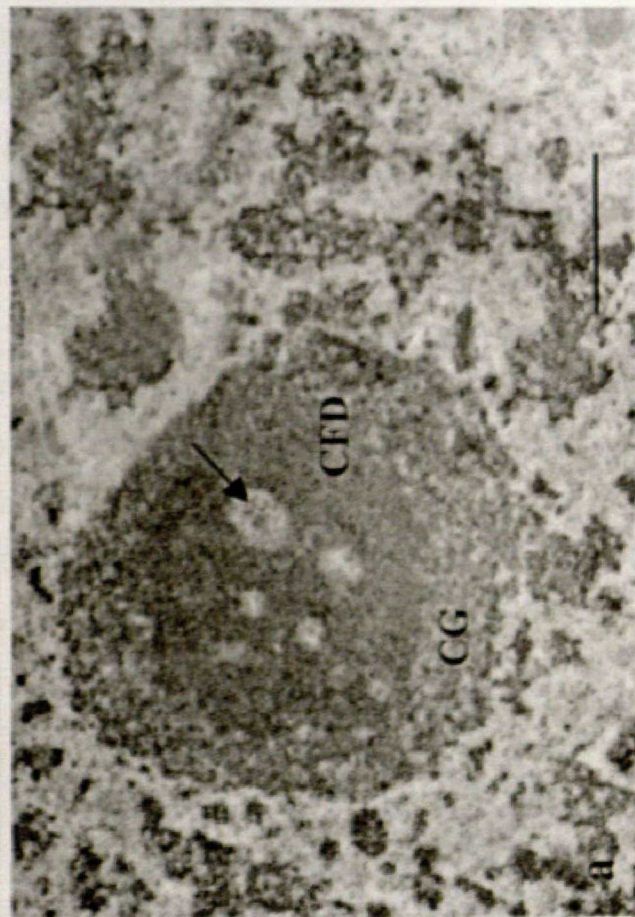


Figura 26.- Organización ultraestructural de nucleolos en fase S (a) y modelos 1 (b) y 2(c) de nucleolos en G2. CG: Componente Granular, CFD: Componente Fibrilar Denso, V: Vacuola. Las flechas indican Centros Fibrilares. La barra de aumentos representa 1 μ m.

3. Distribución *in situ* de las proteínas NopA100 y NopA64 a lo largo de la interfase

Es altamente probable que los cambios en cuanto a la distribución e importancia relativa de los subcomponentes nucleolares observados a lo largo de la interfase vayan acompañados de cambios en cuanto a la distribución de las proteínas NopA100 y NopA64. Para constatar y cuantificar este hecho y comprobar los efectos *in situ* del aumento en las proteínas observado en la progresión del ciclo celular, se realizó una detección inmunocitoquímica de las proteínas a nivel de microscopía electrónica sobre células en las distintas etapas de la interfase. En la figura 27 se muestra una comparativa del marcado de las dos proteínas en G0, G1 y G2.

En nucleolos de células diferenciadas, las dos proteínas presentaron un patrón similar: se distribuyeron de manera difusa en el CFD, sin una preferencia por una región determinada. El número de granos de oro, en ambos casos, fue bajo; no obstante, la NopA100 presenta una mayor densidad de granos de oro por μm^2 ($21 \pm 2,3$) (figura 28a) que la NopA64 (15 ± 3) (figura 28b).

En el caso de G1, para la NopA100, el 13% de los granos de oro se distribuyeron en torno a los CFs y el resto de granos, en el CFD de manera clara (figura 28c), mientras que la NopA64 presentó el 18% del marcado en los CFs o en sus proximidades y el resto de la proteína se localizó en el CFD (figura 28d). El número de granos de oro por μm^2 para la NopA100 fue de $58 (\pm 6)$, mientras que para la NopA64 era de $38 (\pm 3,5)$.

Para la fase G2, el patrón vuelve a repetirse; la NopA100 se distribuye por el CFD y el 17% de los granos se localizan en torno a los CFs (figura 29a). Por su parte, la cantidad de proteína Nop64 próxima a los CFs, o en ellos es del 22% de los granos (figura 29b). La cantidad de granos de oro por μm^2 ha aumentado en comparación con G0 y G1, pero este índice es mucho mayor para la NopA100 ($172 \pm 9,4$) mientras que para la NopA64 es de $62 (\pm 4,6)$ partículas por μm^2 .

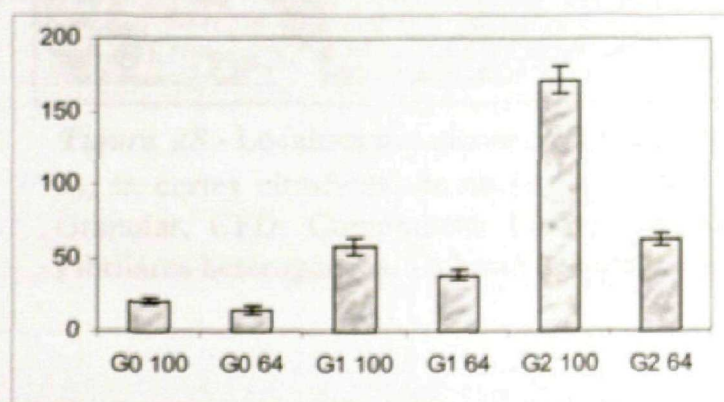


Figura 27.- Diagrama de barras de la cantidad de marcado, en granos de oro, de la NopA100 y NopA64 en G0, G1 y G2. Se muestra la desviación estándar para cada barra.

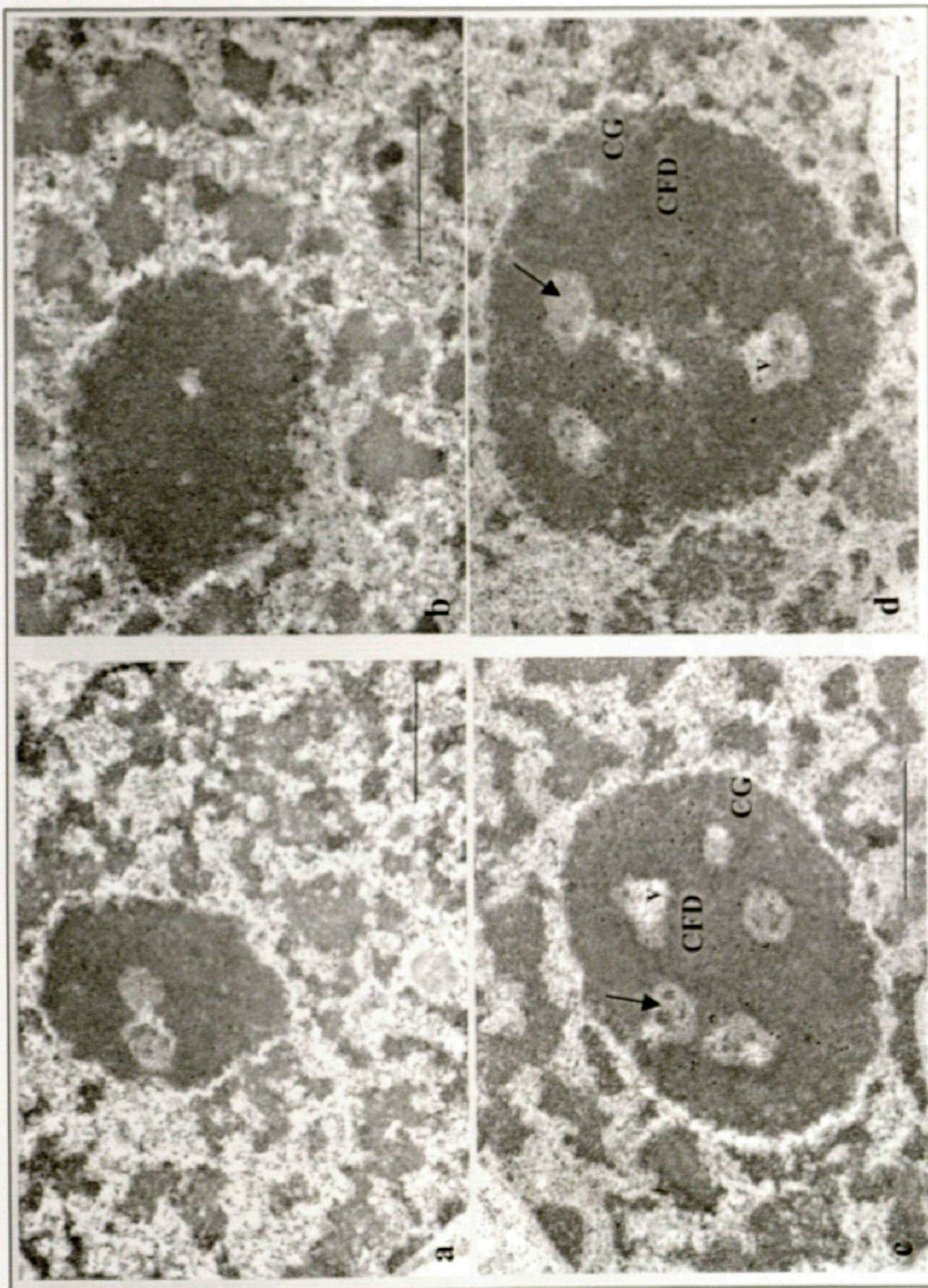


Figura 28.- Localización ultraestructural de las proteínas NopA100 (**a** y **c**), y NopA64 (**b** y **d**), en cortes ultrafinos, de nucleolos en fase G0 (**a** y **b**) y G1 (**c** y **d**). CG: Componente Granular, CFD: Componente Fibrilar Denso, V: Vacuola. Las flechas indican Centros Fibrilares heterogéneos. La barra de aumentos representa 1μm.

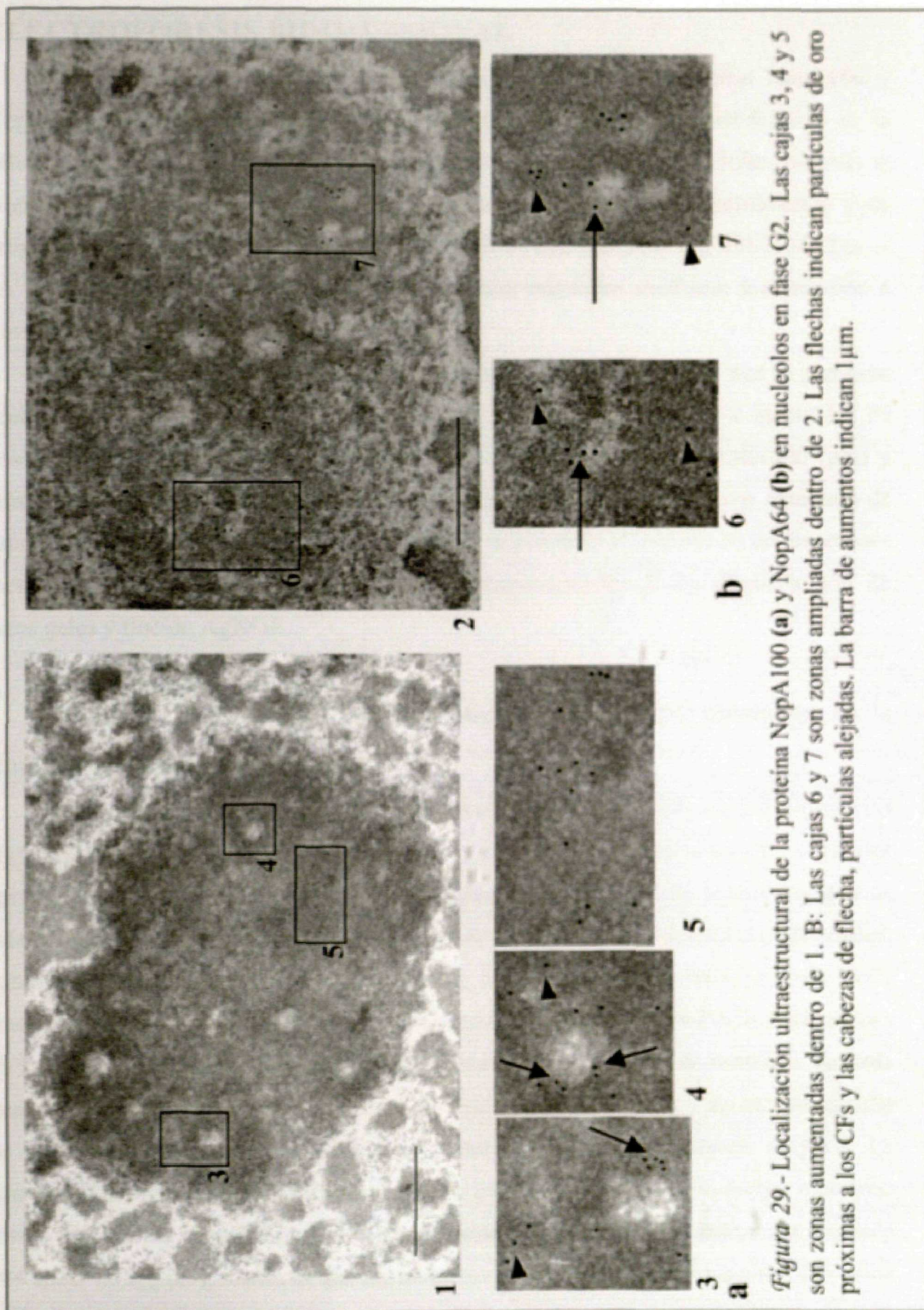


Figura 29. - Localización ultraestructural de la proteína NopA100 (a) y NopA64 (b) en nucleolos en fase G2. Las cajas 3, 4 y 5 son zonas aumentadas dentro de 1. B: Las cajas 6 y 7 son zonas ampliadas dentro de 2. Las flechas indican partículas de oro próximas a los CFs y las cabezas de flecha, partículas alejadas. La barra de aumentos indican 1µm.

V.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS SEPARADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

En las secciones precedentes hemos descrito cómo las proteínas NopA100 y NopA64 muestran importantes cambios en dependencia del estado proliferativo de la célula y en cuanto a su abundancia con respecto a las fases del ciclo celular. Además la NopA100 presenta un patrón proteolítico, también dependiente de proliferación y de progreso en el ciclo. Por otra parte, estudios previos (De Cárcer *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2001) mostraron cómo estas proteínas estaban reguladas mediante fosforilación a través de diferentes quinasas.

Como un paso más hacia adelante, para observar las diferencias que se pudiesen producir en cuanto a la carga de proteínas de las fracciones solubles e insolubles de poblaciones meristemáticas y no meristemáticas atendiendo al peso molecular (pm) y punto isoeléctrico (pI) de las proteínas, así como para realizar un estudio detallado de estas características de la NopA100 y NopA64, se procedió al análisis de las fracciones mencionadas anteriormente mediante geles bidimensionales (2-D), *Western blot* de estos geles y tinción AgNOR..

1. Análisis de la población meristemática *versus* no meristemática de la fracción soluble de los núcleos

El análisis mediante geles monodimensionales SDS-PAGE mostró diferencias significativas entre la fracción S2 de núcleos de células meristemáticas y células parenquimáticas (ver sección I en estos Resultados). Con objeto de aclarar algunas de estas diferencias y para determinar la existencia de diferencias bioquímicas adicionales, como la fosforilación, entre las proteínas en los diferentes tipos celulares, se analizó esta fracción mediante geles de electroforesis bidimensionales (IEF/SDS-PAGE). El análisis de geles bidimensionales consistió en la comparación del patrón de proteínas de cada muestra, obtenido por triplicado, a partir de células meristemáticas y no meristemáticas de la raíz. Las proteínas fueron detectadas por el método de la tinción de plata. La comparación en cuanto al número de *spots* de proteínas detectadas en ambas muestras, reveló diferencias significativas. El extracto proteico de células meristemáticas contenía 384 *spots* ($DS \pm 6,5$), mientras que las muestras no meristemáticas contenían 209 *spots* ($DS \pm 7,4$) (figura 30).

El peso molecular y el punto isoelectrico de cada *spot* de proteína detectado en el 2-D fueron calculados utilizando cinco proteínas marcadoras que comigraron con los extractos de proteínas. En ambos casos, los *spots* detectados se encontraban en un rango de peso molecular comprendido entre 130 y 30 kDa, y un rango de punto isoelectrico de 3-10. La comparación gel a gel y *spot* a *spot* de patrones 2-D de poblaciones meristemáticas y no meristemáticas mostraron que había un total de 464 *spots* individuales que pudieron ser distribuidos en un gel 2-D "virtual" obtenido por la adición de los patrones proteicos obtenidos de las proteínas de los dos tipos celulares utilizando el programa "PD-Quest" (figura 31). Los datos mostraron que más de la mitad de los *spots* en este gel (255 *spots*; 55% del total) eran específicos para la muestra meristemática, mientras que sólo el 17% (80 *spots*) eran exclusivos del extracto de células diferenciadas. El resto de los *spots* (28%) eran idénticos en ambas muestras en cuanto al peso molecular y el punto isoelectrico, sin entrar en las variaciones cuantitativas que se pueden observar en los *spots* comunes, aunque pudiesen mostrar diferencias en cuanto a la intensidad de la tinción dependiendo del estado proliferativo de la célula. Esto indica que un considerable número de proteínas nucleares solubles (presumiblemente RNPs) se expresan en estrecha asociación con la proliferación celular.

Con el fin de analizar las diferencias en cuanto al punto isoelectrico, los *spots* fueron divididos en tres grupos según el rango de pI, llamados ácido (rango 3-5), ácido/neutro (rango 5,1-7) y neutro/básico (7,1-10) (tabla 1). Este análisis mostró importantes diferencias entre las dos muestras, ya que cerca de la mitad de los *spots* del extracto de células meristemáticas estuvieron distribuidos en los grupos de los extremos, mientras que la mayoría de los *spots* de la muestra no meristemática (74,6%) se localizaron en el rango central (ácido/neutro).

rango pI	Meristemática	%	No meristemática	%
3,0-5,0	97	25,2	36	17,3
5,1-7,0	214	55,7	156	74,6
7,1-10	73	19,1	17	8,1

Tabla 1.- Distribución de los *spots* detectados en geles bidimensionales de los extractos solubles de poblaciones celulares meristemáticas y no meristemáticas, divididos en tres categorías de acuerdo con el rango de pI.

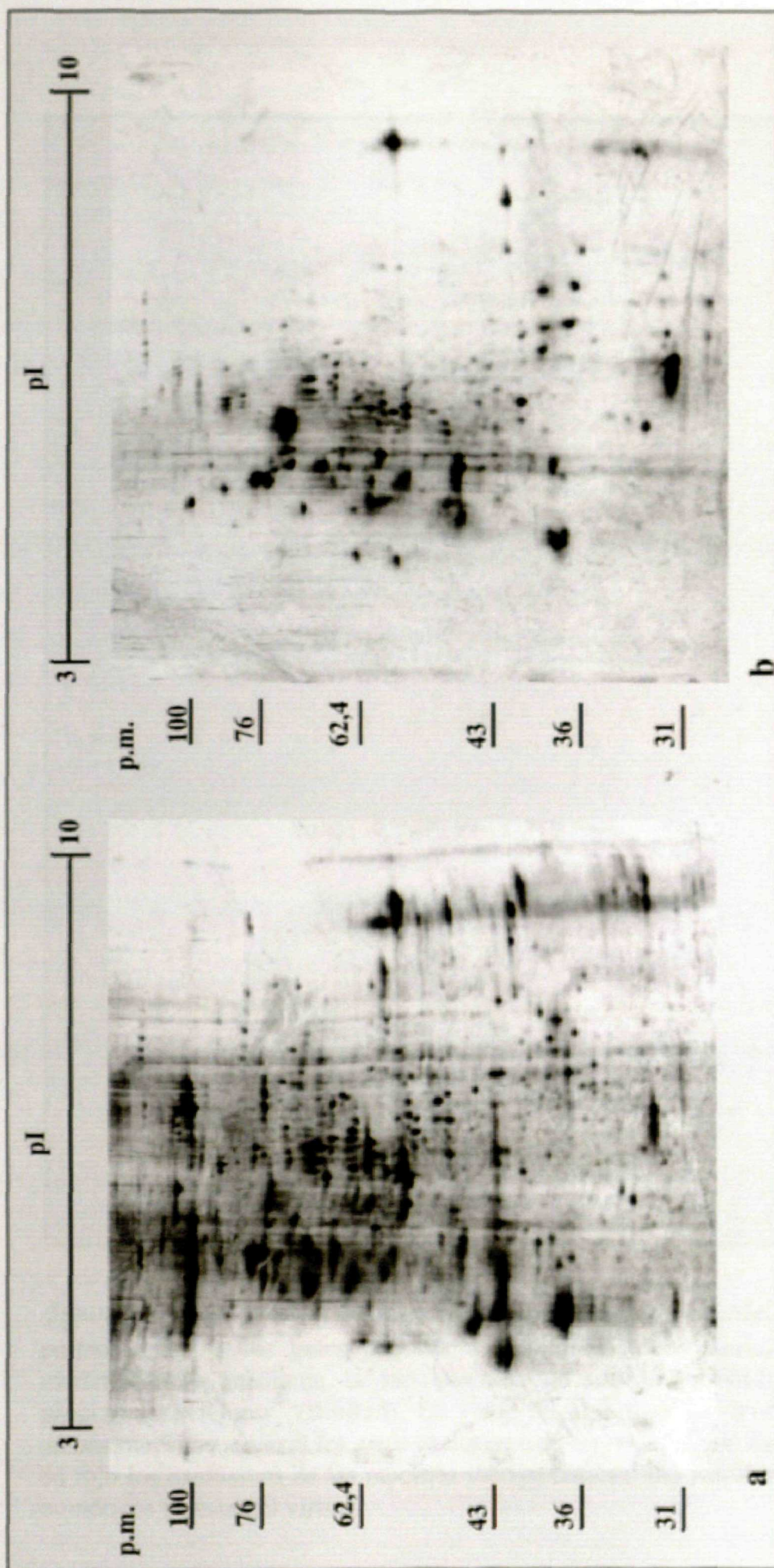


Figura 30. - Patrones de geles bidimensionales, obtenidos después de la tinción con plata de los extractos solubles de proteínas nucleares de células meristemáticas de la raíz (**a**) y no meristemáticas (**b**). En la primera dimensión se utilizaron tiras con rango de punto isoeléctrico (pI) de 3-10. Los marcadores de peso molecular (p.m.) se expresan en kDa.

1.1- Detección, mediante Western blotting, de isoformas de la proteína NapA190

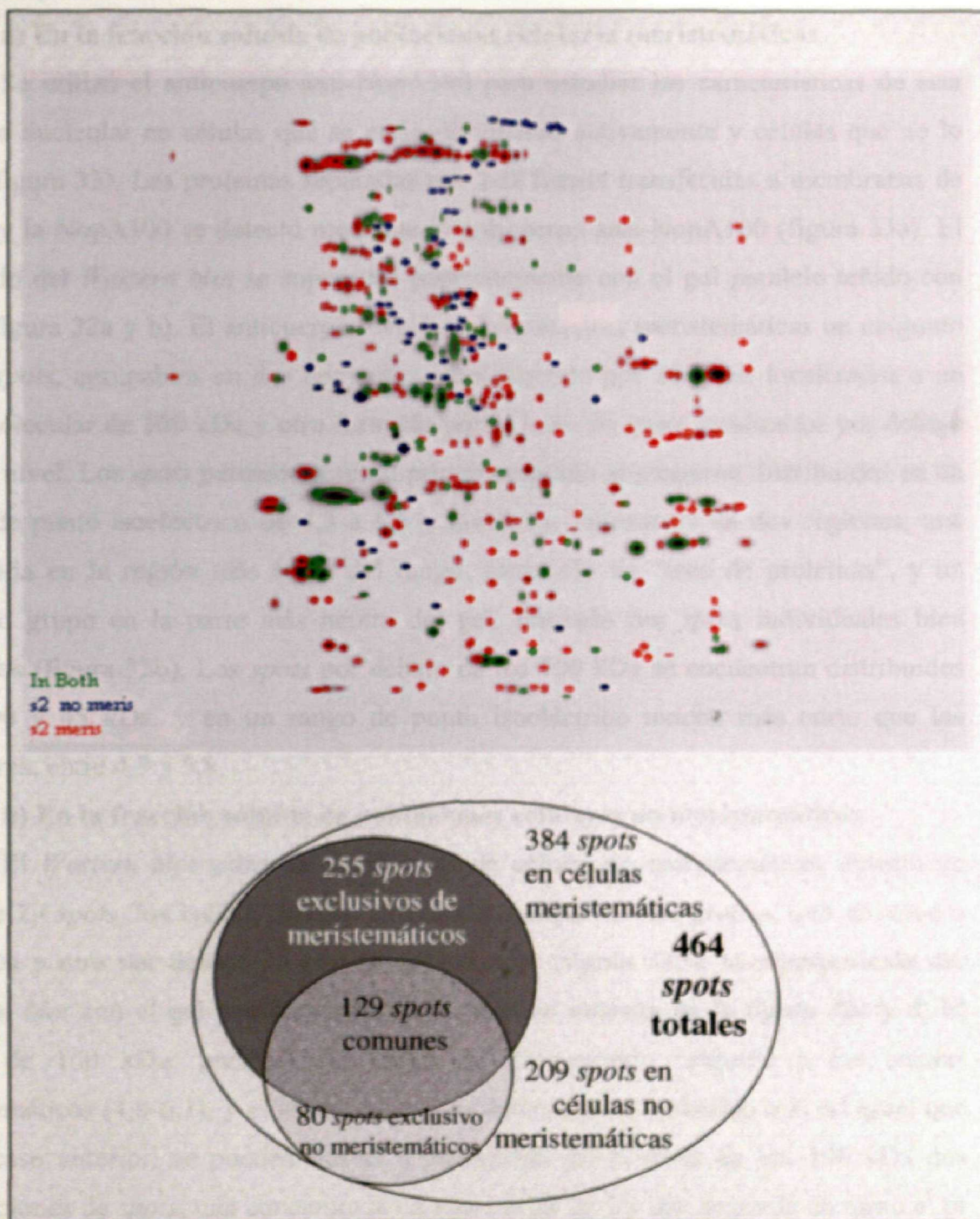


Figura 31.- (a) Gel virtual generado por la combinación de los spots pertenecientes a los geles patrones de las poblaciones meristemáticas y no meristemáticas mediante la superposición de ambas muestras utilizando el programa "PDQuest" (BioRad). En verde se muestran los spots presentes en ambas muestras, en azul los spots exclusivos de las muestras no meristemáticas, y en rojo los exclusivos de las muestras meristemáticas. **(b)** Resultado de los datos numéricos de este gel virtual.

1.1- Detección, mediante *Western blotting*, de isoformas de la proteína NopA100

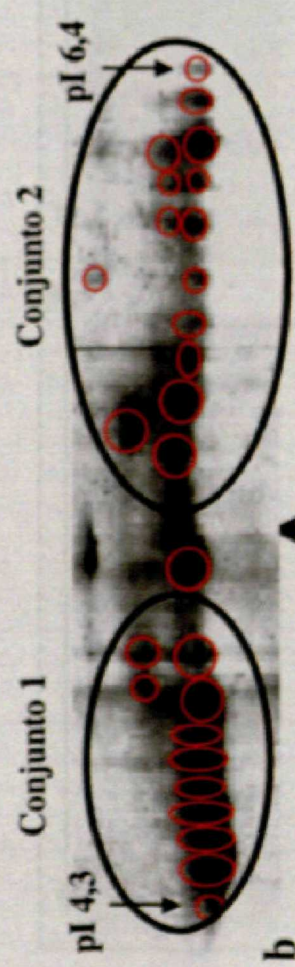
a) En la fracción soluble de poblaciones celulares meristemáticas

Se utilizó el anticuerpo anti-NopA100 para estudiar las características de esta proteína nucleolar en células que se están dividiendo activamente y células que no lo están (figura 33). Las proteínas separadas por 2-D fueron transferidas a membranas de PVDF y la NopA100 se detectó mediante el anticuerpo anti-NopA100 (figura 33a). El resultado del *Western blot* se superpuso posteriormente con el gel paralelo teñido con plata (figura 32a y b). El anticuerpo reveló en las muestras meristemáticas un conjunto de 42 *spots*, agrupables en dos conjuntos, uno formado por 26 *spots* localizados a un peso molecular de 100 kDa y otro formado por el resto de *spots* localizados por debajo de este nivel. Los *spots* pertenecientes al primer conjunto aparecieron distribuidos en un rango de punto isoeléctrico de 4,3 a 6,6 y divididos claramente en dos regiones, una localizada en la región más ácida del rango, formando un “tren de proteínas”, y un segundo grupo en la parte más neutra del gel, formado por *spots* individuales bien definidos (figura 32b). Los *spots* por debajo de los 100 kDa se encuentran distribuidos entre 90 y 45 kDa, y en un rango de punto isoeléctrico mucho más corto que los anteriores, entre 4,9 y 5,8.

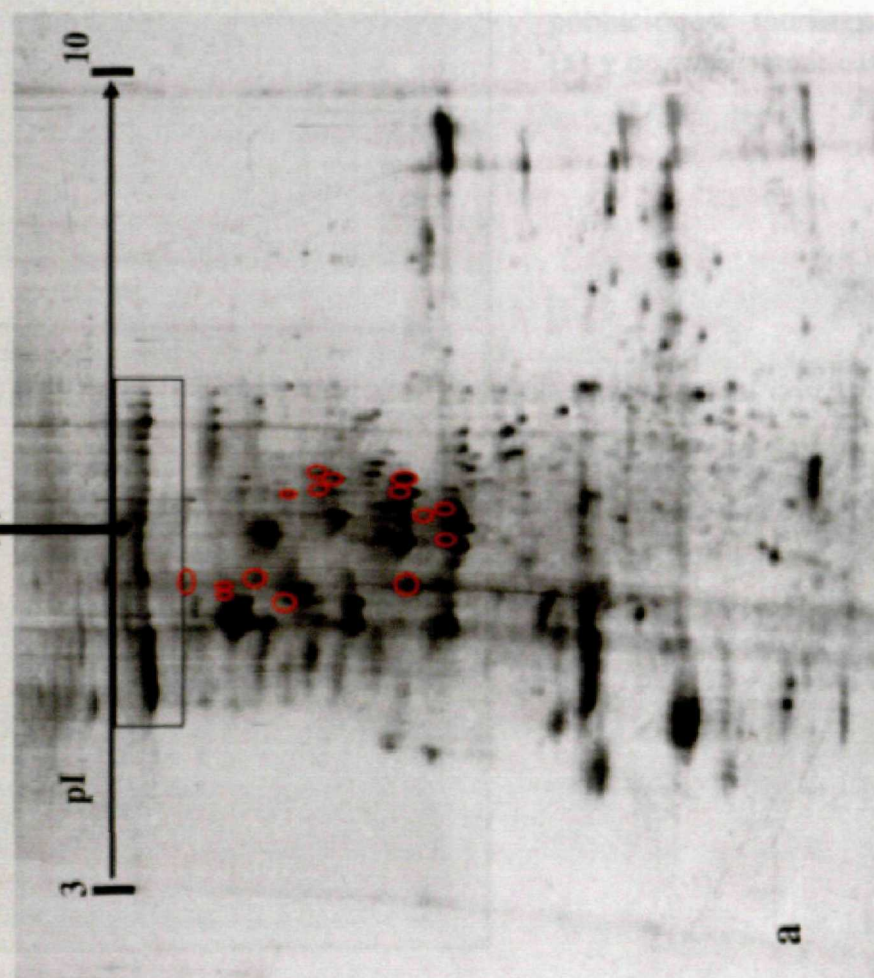
b) En la fracción soluble de poblaciones celulares no meristemáticas

El *Western blot* sobre la fracción S2 de células no meristemáticas detectó un total de 29 *spots*, los cuales también se pueden agrupar en dos grupos, uno en torno a 100 kDa y otro por debajo de este peso molecular (figura 33b); la superposición del *Western blot* con el gel paralelo teñido con plata se muestra en la figura 32c y d. El grupo de 100 kDa, presenta un rango de pI acortado respecto a las células meristemáticas (4,8-6,1), y el número de *spots* detectados es reducido a 8. Al igual que en el caso anterior, se pueden volver a diferenciar en el nivel de los 100 kDa dos agrupaciones de *spots*, una concentrada en torno al pI de 5 y una segunda en torno al pI 6 (figura 32d). En todos los casos, los *spots* eran discretos. Aquellos *spots* situados por debajo de 100 kDa se distribuyen en un rango de peso molecular de 90 a 46 kDa, aunque el 62% de ellos aparecen en torno a 60 ± 3 kDa, con un rango de pI de 5,0-6,1.

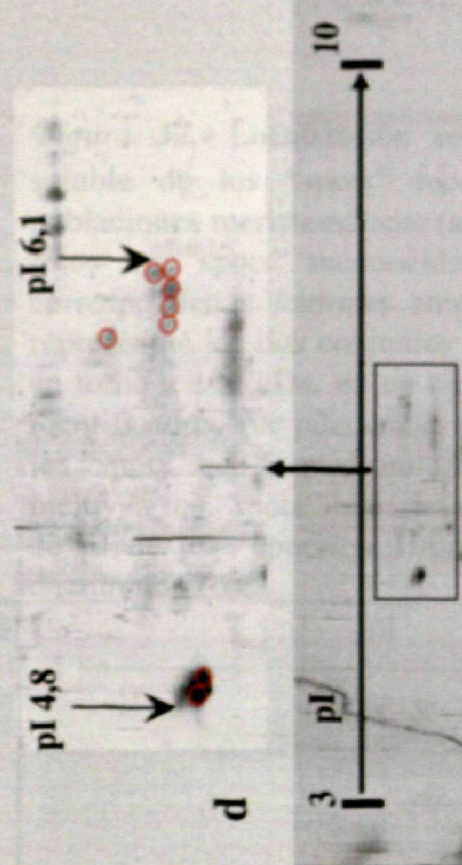
Estos datos de electroforesis 2-D están de acuerdo con los resultados de geles SDS-PAGE monodimensionales y sus correspondientes *Western blots*, en cuanto a que la NopA100 es la proteína principal en el extracto S2 en células proliferantes, y a que su expresión está fuertemente reducida en células no proliferantes.



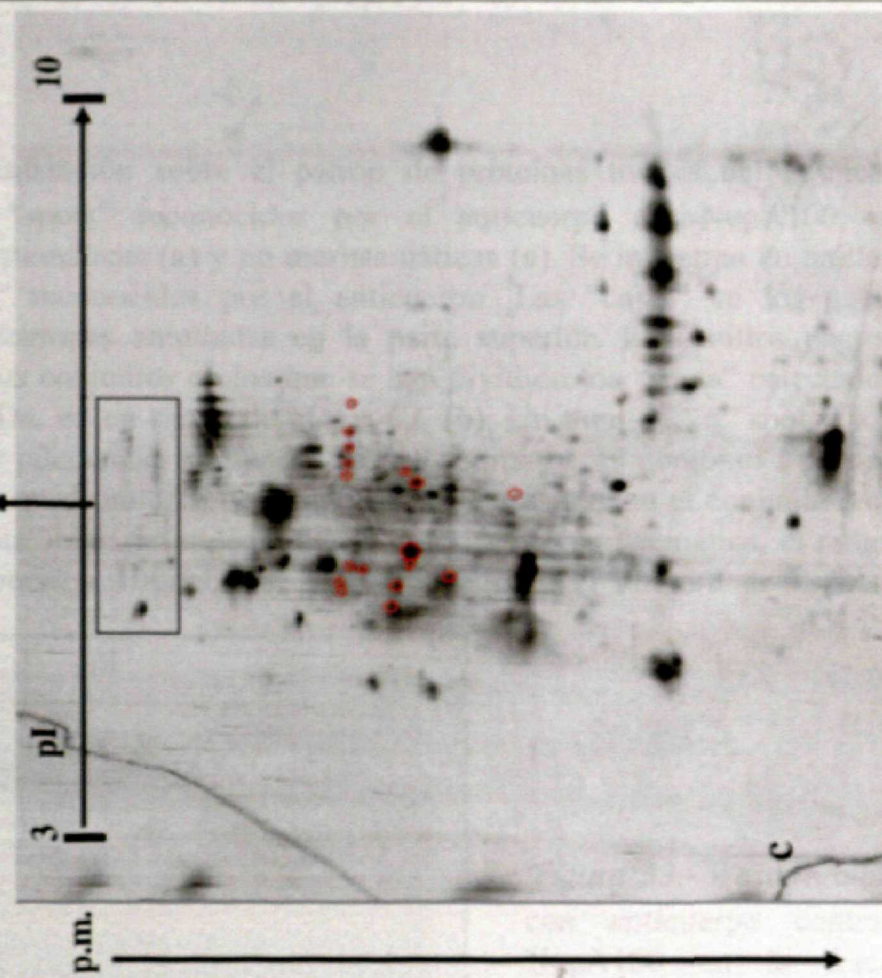
b



a



d



c

Figura 32.- Localización sobre el patrón de proteínas totales del extracto soluble de los "spots" reconocidos por el anticuerpo anti-NopA100 en poblaciones meristemáticas **(a)** y no meristemáticas **(c)**. Se muestran en anillos rojos los "spots" reconocidos por el anticuerpo. Las "cajas" en los geles corresponden a regiones ampliadas en la parte superior. Los anillos negros representan los dos conjuntos en los que se han dividido los "spots" detectados en torno a 100 kDa, en un rango de pI 4,3-6,6 **(b)**. Un total de 26 "spots" son identificados, que pueden ser agrupados en dos conjuntos. El conjunto 1 agrupa los "spots" que forman un "tren de proteínas", mientras que en el conjunto 2 se incluyen los "spots" bien definidos. Para la muestra no meristemática, el rango de pI de los "spots" a 100 kDa se ve estrechado, y el número de "spots" disminuido **(d)**.

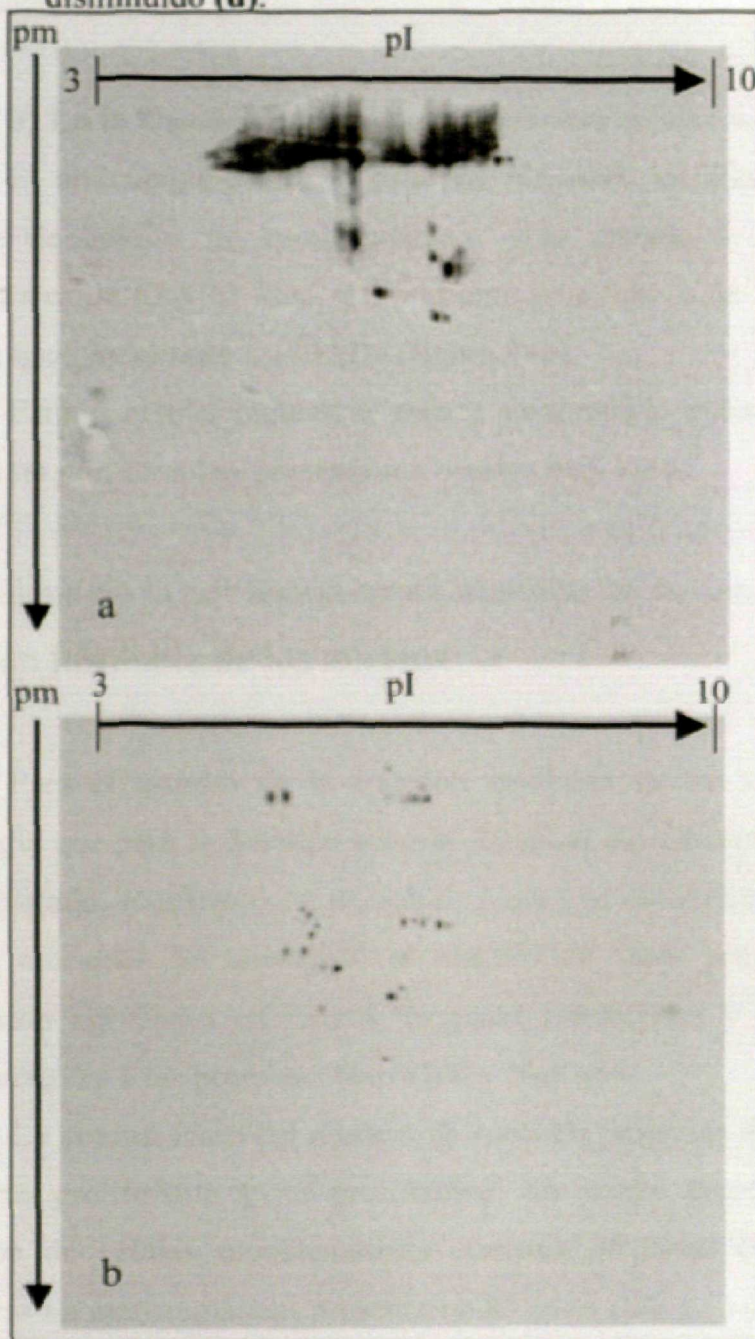


Figura 33.- Western blotting con anticuerpo contra la NopA100 en la fracción soluble de los núcleos de poblaciones meristemáticas **(a)** y no meristemáticas **(b)**.

1.2- Detección, mediante *Western blotting*, de la proteína NopA64

a) En la fracción soluble de poblaciones celulares meristemáticas

El *Western blot* realizado sobre el extracto soluble de células meristemáticas, utilizando un anticuerpo contra la proteína NopA64, detectó un total de 26 *spots*. De éstos, 18 coincidieron con *spots* localizados a 100 kDa y detectados por el anticuerpo contra la proteína NopA100. Los 8 restantes, se localizaron a un rango de peso molecular de 65 a 60 kDa, y de punto isoeléctrico de 4,1 a 5 (figura 34a).

Al igual que sucedía en el *Western blot* de geles monodimensionales SDS-PAGE, la NopA64 reconoce a la NopA100 a un peso molecular de 100 kDa, a la vez que detecta sus polipéptidos específicos en torno a 64 y 61 kDa.

b) En la fracción soluble de poblaciones celulares no meristemáticas

El anticuerpo contra la proteína NopA64, en *Western blot* sobre el extracto soluble de células no meristemáticas, sólo detectó 4 *spots*, localizados a pesos moleculares de 62 y 61 kDa, y a un punto isoeléctrico de 5,2. En este caso no detectó ningún *spot* localizado a 100 kDa (figura 34b).

Esto vuelve a indicar la escasa importancia cuantitativa de esta proteína en células no proliferantes, presentando niveles muy bajos.

2. Análisis de la población meristemática *versus* no meristemática de la fracción insoluble de los núcleos

Para el estudio de la fracción insoluble de los núcleos se siguió la misma estrategia que para la fracción soluble. Después de realizarse los geles bidimensionales por triplicado, se tiñeron con tinción de plata y se obtuvieron los patrones para cada una de las muestras. Se cuantificó el número de *spots* presentes en cada muestra, se analizaron agrupados en rangos de punto isoeléctrico y se estudiaron las isoformas pertenecientes a las proteínas NopA100 y NopA64.

La comparación del número de *spots* de proteínas detectados en cada una de las muestras proliferante y no proliferante, no revela grandes diferencias. El extracto proteico de células meristemáticas contenía 88 *spots* ($DS \pm 6$), mientras que las muestras no meristemáticas presentaron 83 *spots* ($DS \pm 7$) (figura 35).

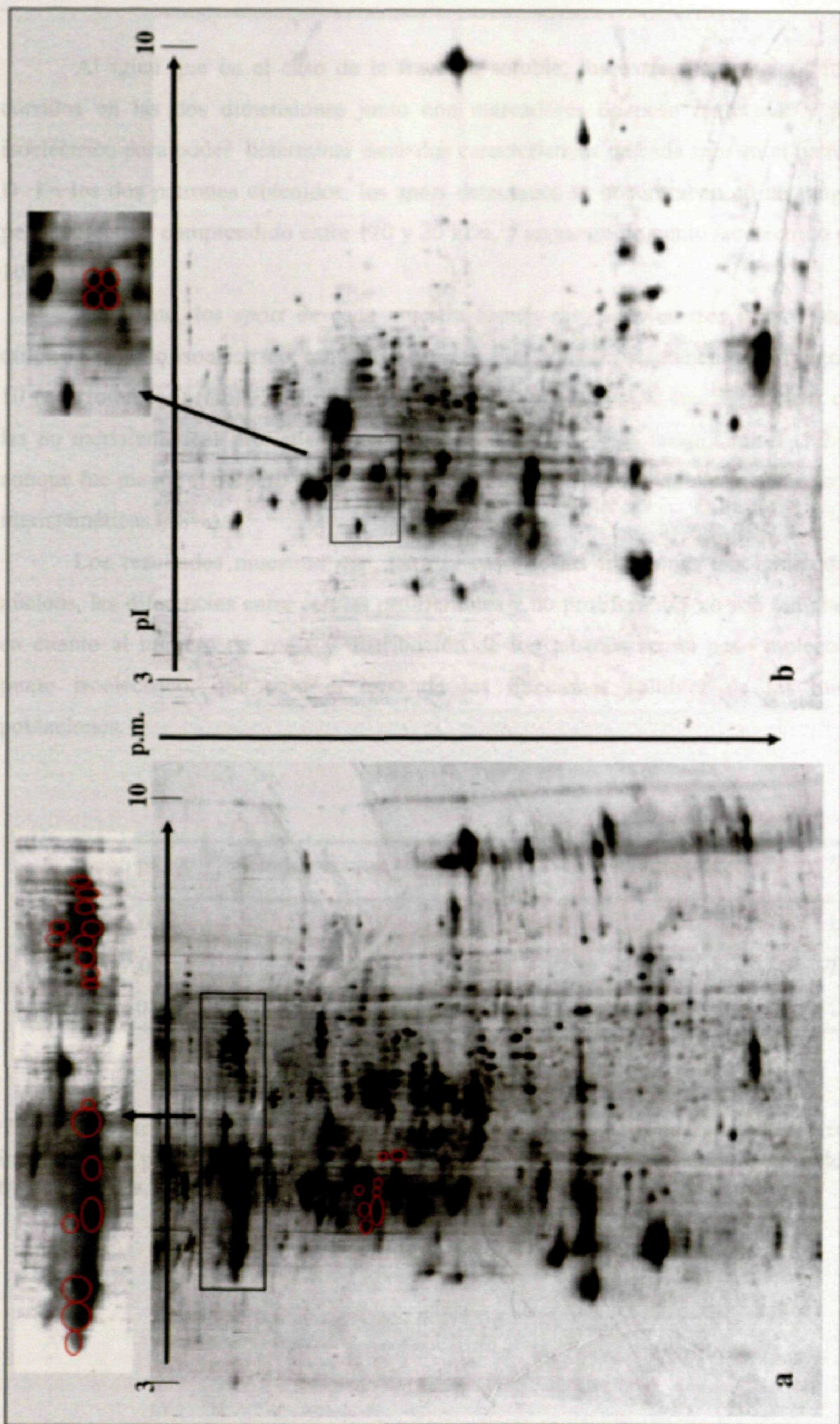


Figura 34.- Western blotting con el anticuerpo contra la NopA64 en extractos solubles de poblaciones meristemáticas (a) y no meristemáticas (b). Se muestran en anillos rojos los spots reconocidos por el anticuerpo. Las cajas de los geles son regiones ampliadas.

Al igual que en el caso de la fracción soluble, los extractos proteicos fueron corridos en las dos dimensiones junto con marcadores de peso molecular y punto isoeléctrico para poder determinar estas dos características de cada *spot* en el patrón 2-D. En los dos patrones obtenidos, los *spots* detectados se encontraban en un rango de peso molecular comprendido entre 120 y 20 kDa, y un rango de punto isoeléctrico de 3-10.

Asimismo, los *spots* de cada muestra fueron divididos en tres grupos bajo el criterio de punto isoeléctrico: rango 3-5 (ácido), rango 5,1-7 (ácido/neutro) y rango 7,1-10 (neutro/básico) (tabla 2). En esta fracción, tanto las muestras meristemáticas como las no meristemáticas presentaron una mayoría de *spots* en el rango central (5,1-7,0), aunque fue mayor el número en las muestras no meristemáticas (71%) con respecto a las meristemáticas (58%).

Los resultados muestran que, para el caso de las fracciones insolubles de los núcleos, las diferencias entre células proliferantes y no proliferantes no son tan grandes en cuanto al número de *spots* y distribución de los mismos según peso molecular y punto isoeléctrico, que para el caso de las fracciones solubles de las mismas poblaciones.

rango pI	Meristemática	%	No meristemática	%
3,0-5,0	23	26	10	12
5,1-7,0	51	58	59	71
7,1-10	14	16	14	17

Tabla 2.- Distribución de los *spots* detectados en geles bidimensionales de los extractos insolubles de poblaciones celulares meristemáticas y no meristemáticas. Se dividen en tres categorías, de acuerdo con el rango de pI.

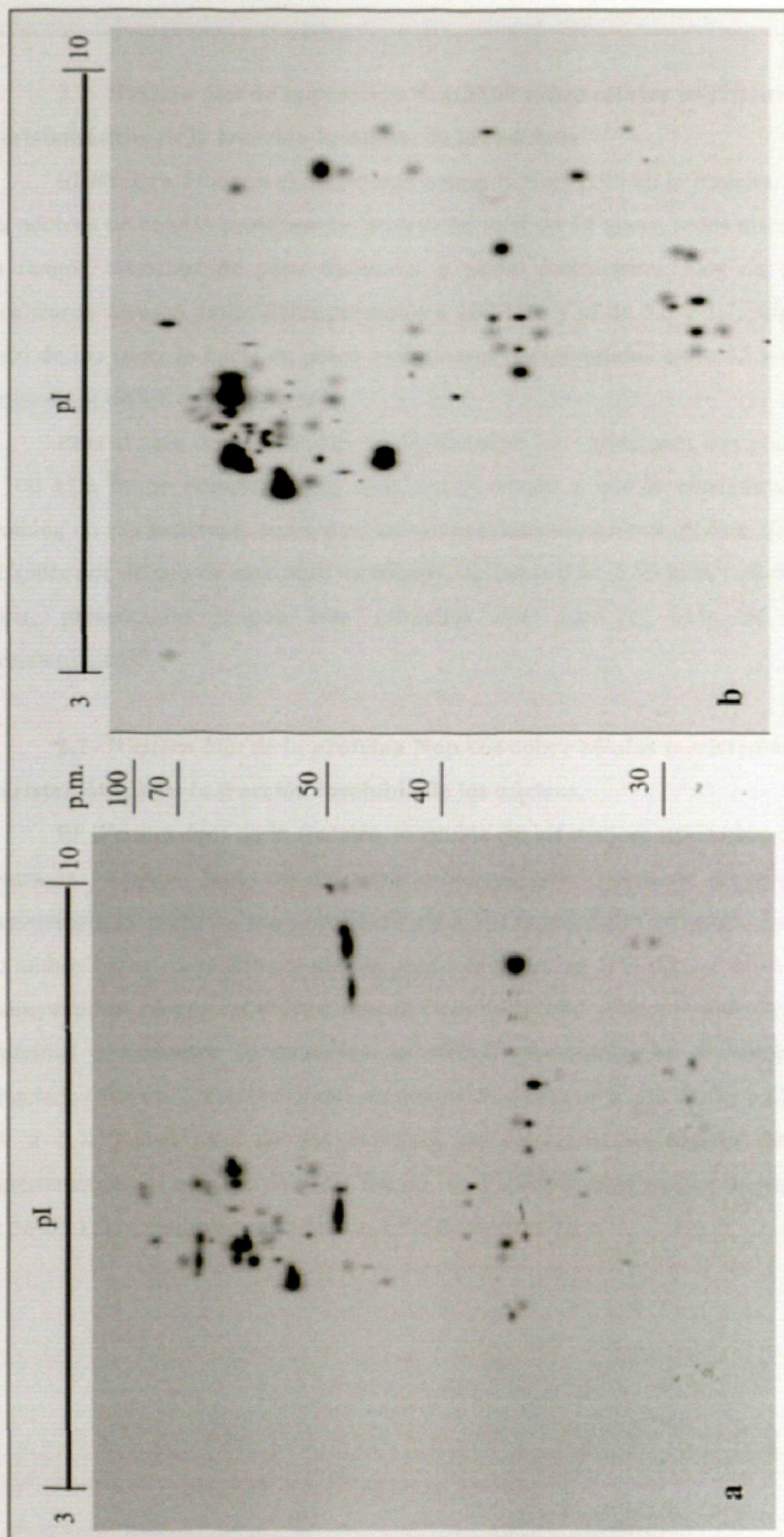


Figura 35.- Patrones de geles bidimensionales, teñidos con nitrato de plata, de los extractos insolubles de proteínas nucleares de células de la raíz meristemáticas (**a**) y no meristemáticas (**b**). En la primera dimensión se utilizaron tiras con rango de punto isoelectrico (pI) de 3-10. Los marcadores de peso molecular (p.m.) se expresan en kDa.

2.1- Western blot de la proteína NopA100 sobre células meristemáticas y no meristemáticas en la fracción insoluble de los núcleos

El *Western blot* con el anticuerpo contra la NopA100 en la fracción insoluble de los núcleos de células proliferantes detectó un total de 14 *spots*, todos ellos localizados en rangos estrechos de peso molecular y punto isoelectrico. Dos de los *spots* se localizaron a pesos moleculares próximos a 100 kDa y pI de 5,6 y 5,7, mientras que el resto de los *spots* lo hacía en pesos moleculares comprendidos entre 52 y 63 kDa y un rango de pI de 4,8 a 6 (figura 36).

Para el caso de poblaciones no proliferantes las variaciones son pocas. En torno a 100 kDa no se detecta ningún *spot*, quizá debido a que la concentración de esta proteína no sea suficiente como para ser detectada mediante esta técnica. Sí se localizan 12 *spots* por debajo de este peso molecular, en torno a 58 y 63 kDa y pI de 5,0-5,8, es decir, presentando rangos más estrechos que para el caso de poblaciones meristemáticas.

2.2- Western blot de la proteína NopA64 sobre células meristemáticas y no meristemáticas en la fracción insoluble de los núcleos

El *Western blot* de la fracción insoluble de los núcleos utilizando el anticuerpo contra la NopA64, tanto en extractos proteicos procedentes de núcleos de células meristemáticas como no meristemáticas tiene como resultado un patrón muy parecido. En ambos casos no se detecta ningún *spot* a la altura de 100 kDa, y todos los *spots* se encuentran en rangos muy estrechos de peso molecular y punto isoelectrico. Para las proteínas procedentes de extractos de células meristemáticas, el número de *spots* detectados fueron 7, comprendidos en rangos de peso molecular de 53 y 63, y de pI de 4,9 a 5,7. En el caso de los extractos de proteínas procedentes de células no meristemáticas el número de *spots* fue de 10, distribuidos en rangos de peso molecular de 56-63 kDa y punto isoelectrico de 4,8-5,8 (figura 37).

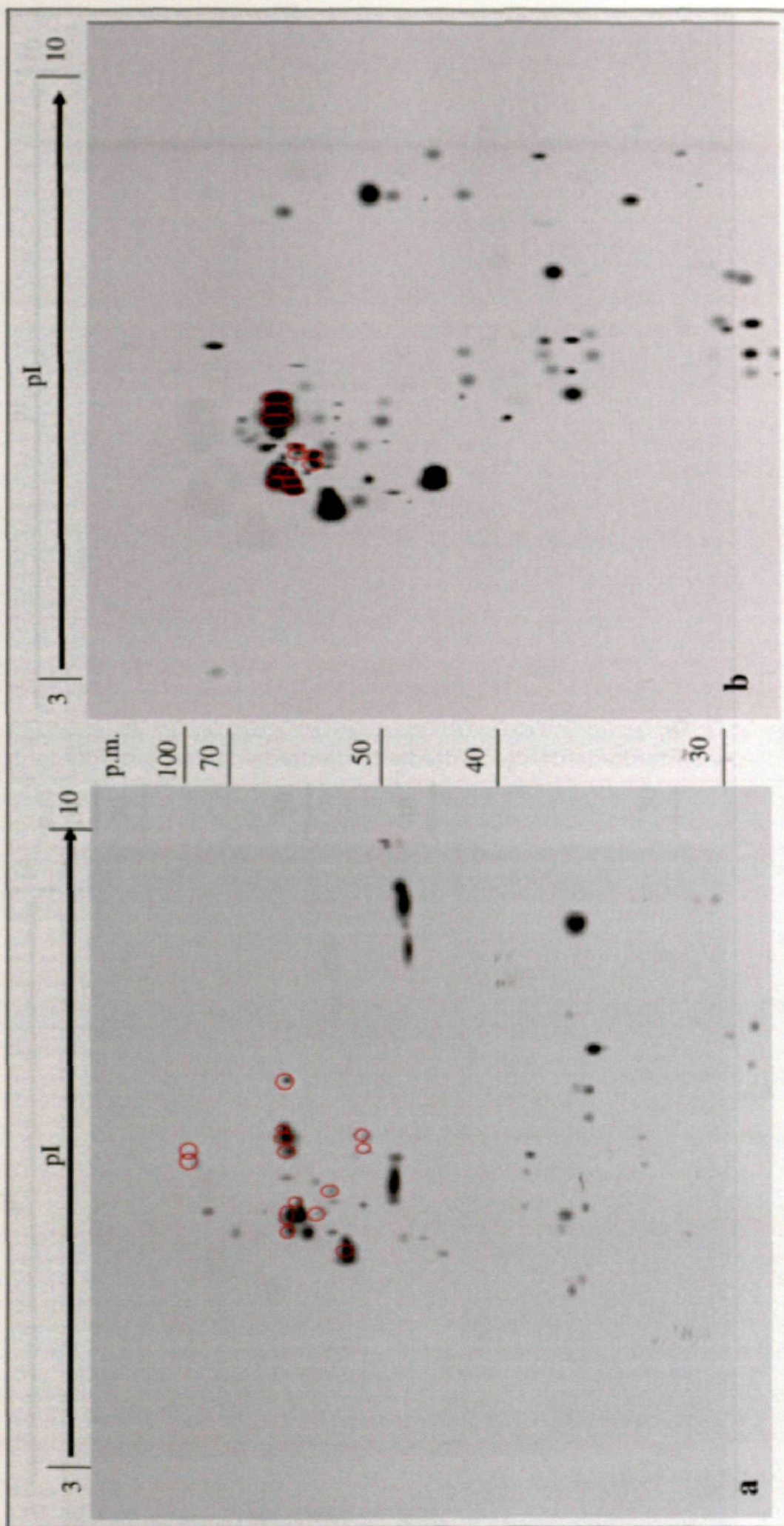


Figura 36.- Western blotting con el anticuerpo contra la NopA100 en extractos insolubles de poblaciones meristemáticas (a) y no meristemáticas (b). Se muestran en anillos rojos los spots reconocidos por el anticuerpo.

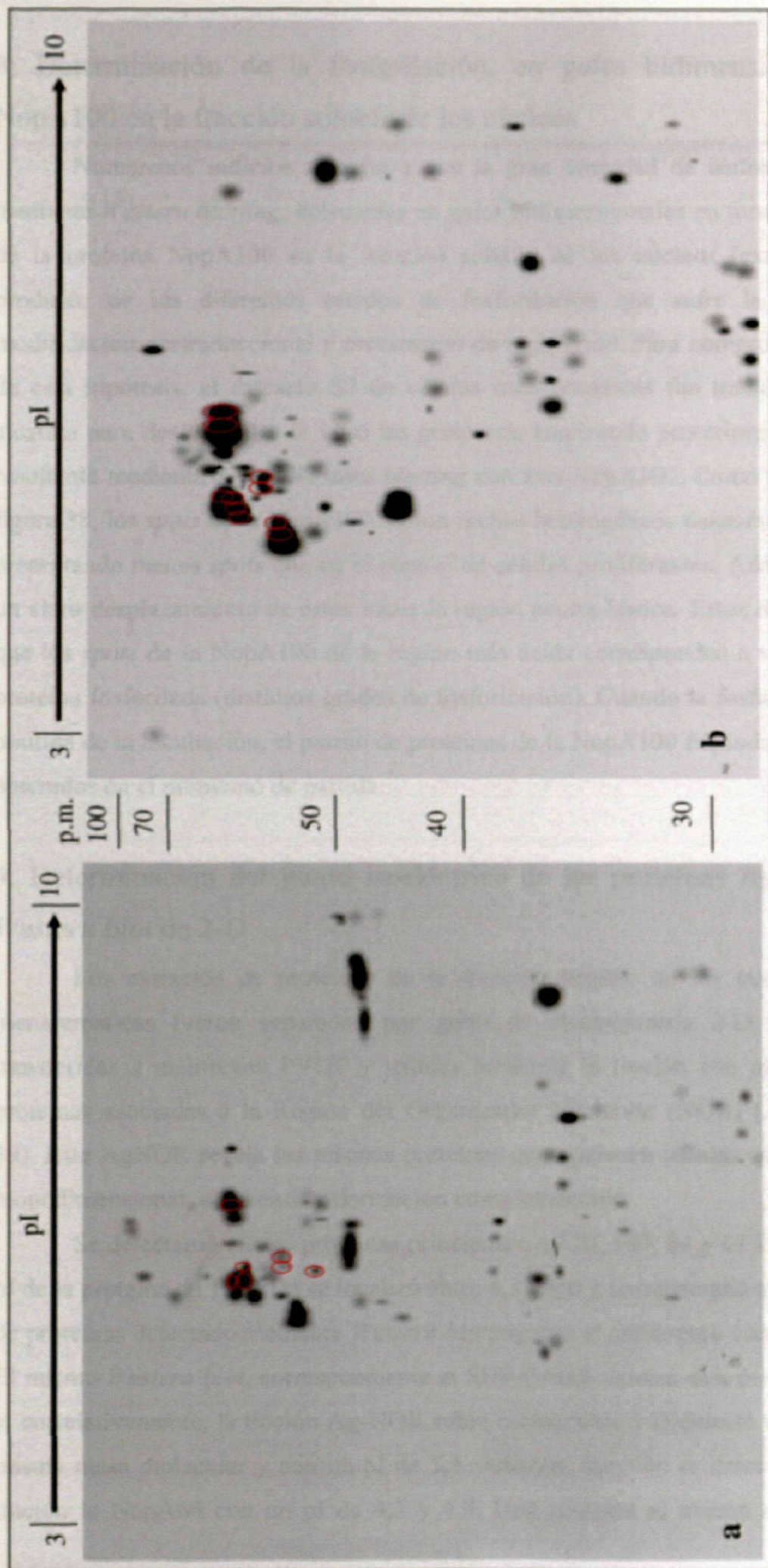


Figura 37.- Western blotting con el anticuerpo contra la NopA64 en extractos insolubles de poblaciones meristemáticas (a) y no meristemáticas (b). Se muestran en anillos rojos los spots reconocidos por el anticuerpo

3. Determinación de la fosforilación, en geles bidimensionales, de la NopA100 en la fracción soluble de los núcleos

Numerosos indicios apuntan a que la gran variedad de isoformas localizadas mediante *Western blotting*, detectadas en geles bidimensionales en torno a los 100 kDa de la proteína NopA100 en la fracción soluble de los núcleos (extractos S2), son producto de los diferentes estados de fosforilación que sufre la proteína como modificación postraducciona y mecanismo de regulación. Para comprobar la veracidad de esta hipótesis, el extracto S2 de células meristemáticas fue tratado con fosfatasa alcalina para desfosforilar *in vitro* las proteínas, analizando posteriormente el extracto resultante mediante 2-D y *Western blotting* con anti-NopA100. Como se muestra en la figura 38, los *spots* de la NopA100 fueron menos heterogéneos después del tratamiento, presentando menos *spots* que en el control de células proliferantes. Además, se observó un claro desplazamiento de éstos hacia la región neutra-básica. Estos datos demuestran que los *spots* de la NopA100 de la región más ácida corresponden a variaciones de la proteína fosforilada (distintos grados de fosforilación). Cuando la fosfatasa alcalina fue omitida de la incubación, el patrón de proteínas de la NopA100 fue indistinguible de los obtenidos en el momento de partida.

4. Determinación del punto isoelectrico de las proteínas Ag-NOR de los *Western blot* de 2-D

Los extractos de proteínas de la fracción soluble de los núcleos de células meristemáticas fueron separados por geles de electroforesis 2-D y las proteínas transferidas a membrana PVDF y teñidas mediante la tinción con plata selectiva de proteínas asociadas a la Región del Organizador Nucleolar (NOR) (AgNOR) (figura 39). Este AgNOR revela las mismas proteínas que aparecen teñidas en el experimento monodimensional, añadiendo información complementaria.

Se detectaron cuatro proteínas principales, a 120, 100, 64 y 43 kDa. El rango del pI de la proteína de 100 kDa se localizó entre 4,3 y 6,0 y correspondió a la serie de *spots* de proteínas detectado mediante *Western blotting* con el anticuerpo contra la NopA100. El mismo *Western blot*, correspondiente al SDS-PAGE detectó otra proteína a 120 kDa y, correlativamente, la tinción Ag-NOR sobre membranas 2-D detectó una proteína a la misma masa molecular y con un pI de 5,1. Además, también se detectó mediante esta tinción la NopA64 con un pI de 4,3 y 4,9. Una proteína al mismo nivel de 64 kDa

también fue detectada después de la tinción Ag-NOR de células de mamíferos en *Western blot* monodimensionales. Mediante esta tinción también se detectó un conjunto de *spots* en torno a 43 kDa con un rango de pI de 4,9-5,1, y un segundo grupo a 42 kDa con rango de pI 4,3-4,9. Este grupo de *spots* podrían corresponder con el homólogo, en cebolla, de la proteína nucleolar B23 de mamíferos (Roussel y Hernández-Verdun, 1994).

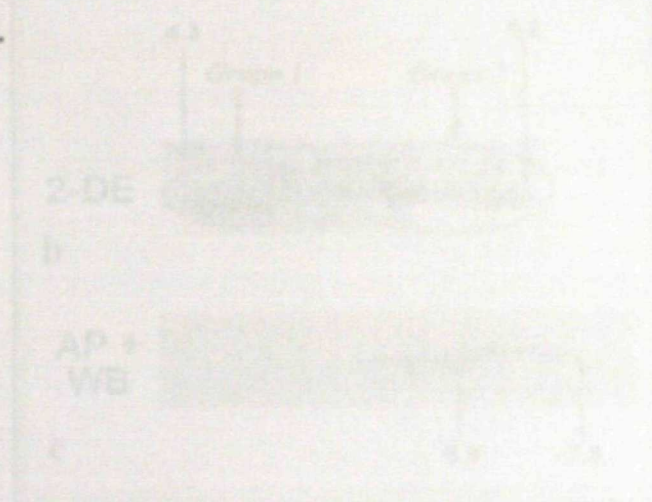


Figura 13. Detección de la proteína B23 en células de mamíferos y en células de cebolla por tinción Ag-NOR y Western blot monodimensional.

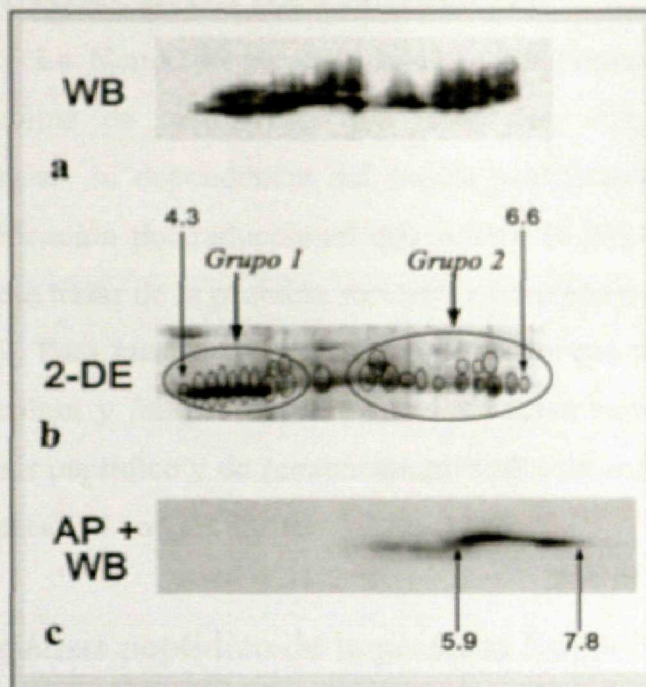


Figura 38.- (a) Detección, mediante *Western blotting*, de la NopA100 a la altura de 100 kDa de peso molecular, en la fracción soluble de los núcleos de células proliferantes. *(b)* Gel correspondiente al *Western blot* anterior, teñido con nitrato de plata; y los conjuntos en los que se agrupan los "spots"; y el rango de pI entre los que se encuentran. *(c)* *Western blotting* después del tratamiento con la fosfatasa alcalina.

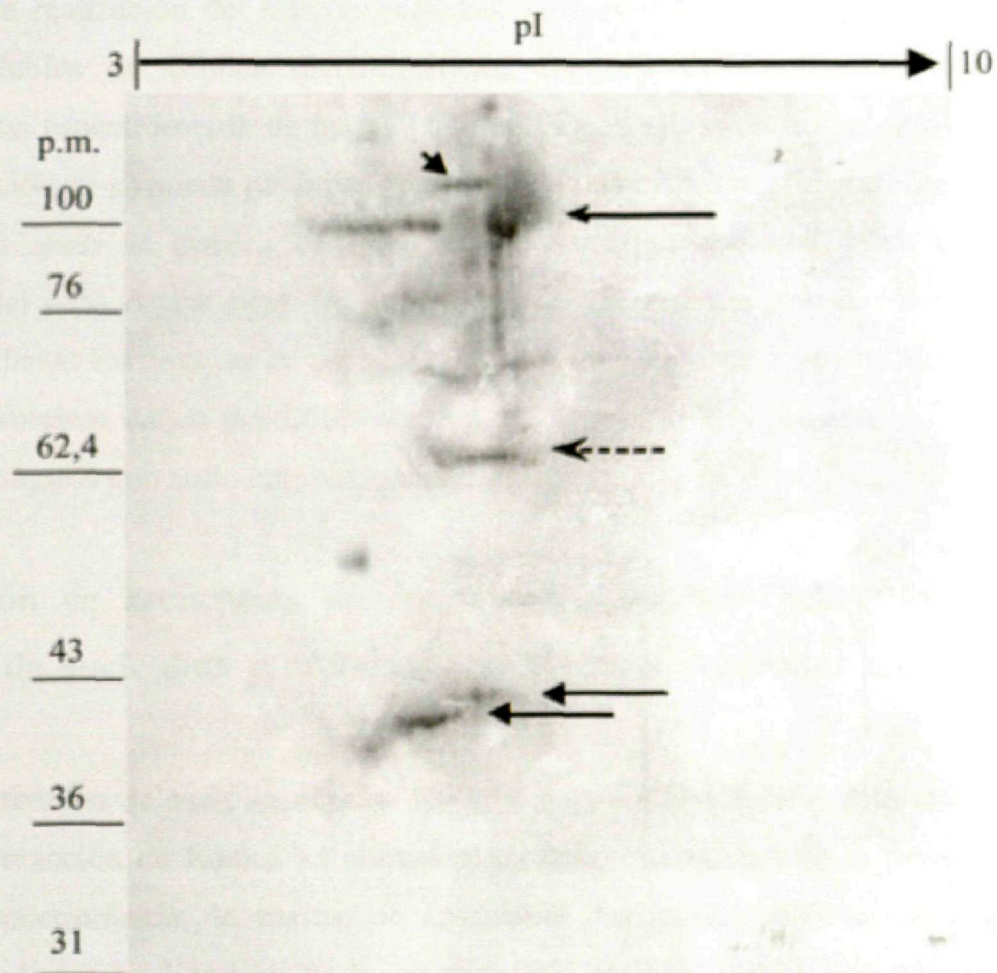


Figura 39.- Detección de las proteínas AgNOR después del gel 2-D y la transferencia a membranas, de la fracción soluble de los núcleos de células meristemáticas

VI.- ESTUDIO PEPTÍDICO Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA NopA100

La NopA100 presenta unas características físico-químicas muy parecidas a la nucleolina de mamíferos, que junto con otras similitudes, como su distribución nucleolar, su dependencia del estado proliferativo de la célula y los mecanismos de modificación postraducciona que sufre a lo largo de la interfase, hacen pensar que se pudiese tratar de la proteína semejante a nucleolina en cebolla.

Para buscar las posibles similitudes que pudiesen existir entre esta proteína, la nucleolina y las proteínas semejantes a nucleolina de otras especies, se procedió al análisis peptídico y de secuencias parciales de aminoácidos de la NopA100 y un estudio comparativo con las secuencias en cuestión.

1. Análisis peptídico de la proteína NopA100

Para la realización del estudio peptídico se partió de un gel bidimensional de proteínas solubles de células meristemáticas. Después de su tinción con plata compatible con espectrometría de masas (figura 40a), se eligieron los *spots* adecuados para la obtención de su huella peptídica (figura 40b). Los mapas peptídicos obtenidos de los diferentes *spots* se pueden considerar idénticos (figura 40c, d y e), con unas semejanzas del 65% de los péptidos, tratándose de diferentes isoformas de la misma proteína. Mediante los motores de búsqueda Mascot, Profound, se buscaron en las bases de datos de proteínas mapas peptídicos semejantes a los obtenidos por nosotros, pero no se encontró ninguno con suficiente semejanza.

2. Obtención de secuencias de aminoácidos de la NopA100 y de las secuencias de nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina en las bases de datos

La obtención de estas secuencias fue abordada siguiendo diferentes estrategias. Mediante la reacción de Edman se obtuvo el extremo N-terminal de la proteína y, a través de espectrometría de masas, se analizaron secuencias internas de péptidos obtenidos mediante la digestión de la proteína por tripsina. Por último, mediante el programa De Novox, se obtuvo la secuencia de otros péptidos a partir de espectros de fragmentación obtenidos por ms/ms. Los péptidos analizados mediante las distintas estrategias se representan en la tabla 3.

Secuencia del péptido	Técnica de obtención	% identidad con nucleolina
AKIQKNAGXPK	Edman	63,6
KNEVEEERLK	MS/MS	50
MTNSNYYPSSK	DeNovoX	37,37
YVVMDECK	DeNovoX	55,6
LPYPWSNK	DeNovoX	Sin resultado
THRDYTTK	MS/MS	Sin resultado

Tabla 3.- Relación de las secuencias de péptidos de la NopA100 indicando la técnica mediante la cual se han obtenido, y el porcentaje de identidad que presenta cada péptido al ser alineado con la secuencia de aminoácidos de la nucleolina humana.

Por otra parte, para obtener las secuencias de aminoácidos de las proteínas descritas como nucleolina o semejantes a nucleolinas se realizó la búsqueda en las bases de datos de proteínas Swiss-Prot y TrEMBL. Se eligieron las proteínas de las que se disponía de las secuencias completas y se descartaron aquellas de las que sólo se tenía conocimiento de secuencias parciales. Se obtuvieron un total de 15 secuencias pertenecientes a una gran variedad de organismos. Todos ellos eran eucariotas repartidos en distintos grupos: cordados (*Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Cyprinus carpio*, *Xenopus laevis*) un procordado (*Ciona intestinalis*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Nicotiana tabacum*) y un protozoo (*Tetrahymena thermophila*) (tabla 4).

3. Estudio del extremo N-terminal de la NopA100 y análisis comparativo con otras proteínas

La secuencia de aminoácidos de la banda de 100 kDa obtenida mediante la degradación de Edman fue lanzada contra la secuencia completa de la nucleolina de humanos, con número de identificación P19338 en la base de datos de proteínas Swiss-Prot/TrEMBL, mediante los programas de alineamiento LALIGN o SIM. El péptido

Número de acceso	Cita	Organismo	Descripción	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)
P19338	Srivastava, <i>et al.</i> , 1989	<i>Homo sapiens</i> (Humano)	Nucleolina (proteína C23)	706	76,2
P08199	Lapeyre <i>et al.</i> , 1987	<i>Mesocricetus auratus</i> (Hamster)	Nucleolina	713	76,9
P09405	Bourbon <i>et al.</i> , 1988	<i>Mus musculus</i> (Ratón)	Nucleolina	706	76,6
P13383	Bourbon y Amalric, 1990	<i>Rattus norvegicus</i> (Rata)	Nucleolina	712	77
P15771	Maridor y Nigg, 1990	<i>Gallus gallus</i> s (Pollo)	Nucleolina	694	75,6
Q804J2	Alvarez <i>et al.</i> , 2002	<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa)	Nucleolina	693	73,8
	Caizergues-Ferrer <i>et al.</i> , 1989	<i>Xenopus laevis</i>	Nucleolina	650	70
P20397	Rankin <i>et al.</i> , 1993				
Q9U8P6	Taka y Nishikata, 2000 Taka <i>et al.</i> , 2000	<i>Ciona intestinalis</i> (Ascidia)	Semejante a nucleolina	529	58
P27476	Lee <i>et al.</i> , 1991	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nsr1	414	44,5
P41891	Gulli <i>et al.</i> , 1995	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Gar2	500	52,9
Q9LIH8	Kaneko <i>et al.</i> , 2000	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Semejante a nucleolina	610	66,2
Q40363	Bögge <i>et al.</i> , 1996	<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	NucMs1	635	67,1
Q41042	Tong <i>et al.</i> , 1995	<i>Pisum sativum</i> (Guisante)	Semejante a nucleolina	611	64,7
Q8LNZ4	Maeshima y Matsuda, 2002	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco)	Nucleolina	620	65,1
Q27199	McGrath <i>et al.</i> , 1997	<i>Tetrahymena thermophila</i> (Protozoo)	Fosfoproteína nucleolar (Nopp52)	476	51,7

Tabla 4.- Datos disponibles sobre la nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina en los distintos organismos. En cada caso se muestra el número de acceso a la base de datos de proteínas Swiss-Prot o TrEMBL de la nucleolina, la cita de referencia de cada secuencia, el nombre que se le ha dado a cada una, el número de aminoácidos y el peso molecular expresado en kilodaltons. Las direcciones URL de las bases de datos son: <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/access.html>, o <http://us.expasy.org/sprot/>; <http://srs.embl-heidelberg.de:8000/>.

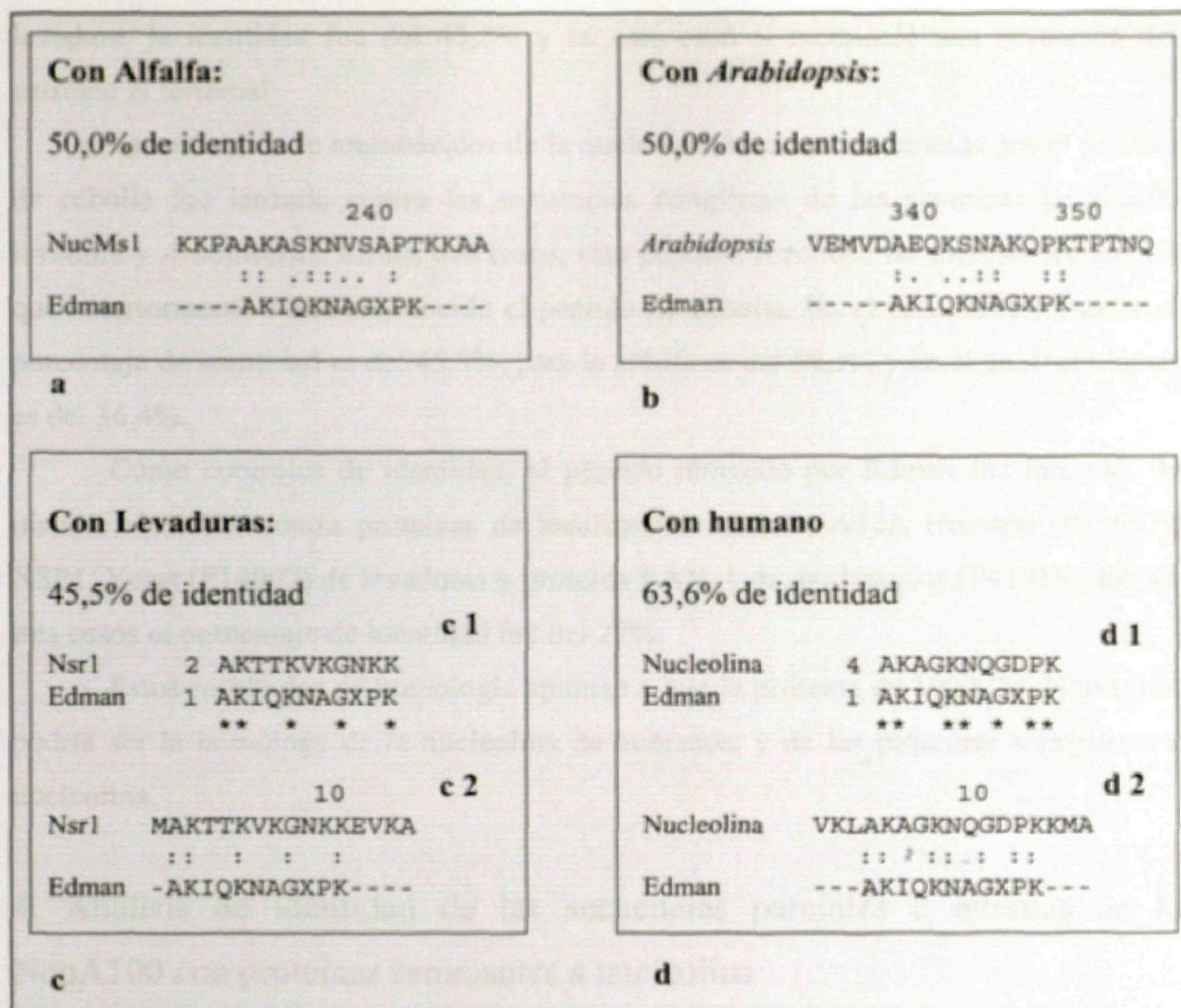


Figura 41.- Representación esquemática del alineamiento del péptido obtenido mediante la degradación de Edman a partir de la NopA100 con diferentes organismos. **(a)** Alineamiento, mediante el programa "lalign" con la secuencia de la proteína NucMsl de alfalfa. **(b)** Con nucleolina de *Arabidopsis*. **(c)** Con la proteína Nsr1 de *S. cerevisiae*, **c1** mediante el programa "SIM", y mediante el programa "lalign" (**c 2**). **(d)** Alineamiento con la nucleolina humana, mediante el programa "SIM" (**d 1**) y mediante el programa lalign (**d 2**). En todos los casos se muestran los porcentajes de identidad. Los asteriscos y los dos puntos representan la identidad total, y el punto la posible similitud.

reconoció una secuencia localizada en el extremo N-terminal de la nucleolina, con un porcentaje de identidad del 63,6% (figura 41d). Esta misma estrategia fue seguida con las secuencias de la NucMsl de alfalfa (Q40363), NSR1 de levaduras (P27476) y la similar a nucleolina de *Arabidopsis* (Q9LIH8) (figura 41a, b, c). Para la alfalfa el porcentaje de identidad fue del 50% y reconoció un péptido situado en la región interna de la proteína. Para *Arabidopsis*, el porcentaje de identidad fue de 45,5%, y al igual que

en alfalfa, el péptido reconocido se situó en una región interna. Para el caso de la levadura, la identidad fue del 45,5% y en este caso sí reconoció una secuencia del extremo N terminal.

La secuencia de aminoácidos de la nucleolina humana reconocida por el péptido de cebolla fue lanzada contra las secuencias completas de las proteínas de alfalfa, levadura y *Arabidopsis*. En los tres casos, este péptido, reconoce las mismas secuencias que anteriormente había reconocido el péptido de cebolla. En el caso de la levadura el porcentaje de identidad es del 45,5%, para la alfalfa es del 58,3% y en el de *Arabidopsis* es del 36,4%.

Como controles de identidad, el péptido obtenido por Edman fue lanzado, de manera aleatoria, contra proteínas de localización nuclear, A32A Humana (P39687), NSP1_Yeast (P14907) de levaduras y proteína RAN_1 de *Arabidopsis* (P41916). En los tres casos el porcentaje de identidad fue del 27%.

Estos resultados de homología apuntan a que la proteína de 100 kDa, NopA100, podría ser la homóloga de la nucleolina de humanos, y de las proteínas semejantes a nucleolina.

4. Análisis de identidad de las secuencias parciales e internas de la NopA100 con proteínas semejantes a nucleolina

Para el análisis de los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas se siguió la misma estrategia que la utilizada para el péptido resultado de la degradación de Edman.

La secuencia obtenida por espectrometría de masas, KNEVEEEERLK, dio un 50% de identidad con la nucleolina humana, de levadura y de alfalfa (figura 42a).

Para el péptido MTNSNYPSKK, obtenido por espectrometría y utilizando el programa DeNovoX, para humanos y alfalfa el porcentaje de identidad es del 37,37% para ambos casos (figura 42b).

Para el péptido YVVMDECK, el porcentaje de identidad fue del 55,6 para humano, 44,4 para levadura y alfalfa (figura 42c).

Para dos de los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas, no se encontraron identidades relevantes con las secuencias de las otras proteínas. Con las otras cuatro secuencias se encontraron homologías comprendidas entre el 63,6 y el 37%.

Humano:	Levadura:	Alfalfa:
50% de identidad	50% de identidad	50% de identidad
264 EEEEEEEPVK 1 KNEVEEERLK * * * *	160 KNEETEEPAT 1 KNEVEEERLK * * * *	332 EESEDEPLK 1 KNEVEEERLK * * * *
270 EEEEEEEPVK .: :.: .: KNEVEEERLK	160 170 KNEETEEPAT .: :. KNEVEEERLK	340 EESEDEPLK .: :.: :. KNEVEEERLK
a		
Humano:	Levaduras:	Alfalfa:
37,37% de identidad	37,37% de identidad	37,37% de identidad
570 SPNARSQPSKT .: :.: MTNSNYYPSSK	320 VQFSNMEDAKK .: :.: MTNSNYYPSSK	470 NNNSNYSAQSG .: :.: MTNSNYYPSSK
b		
Humano:	Levaduras:	Alfalfa:
55,6% de identidad	44,4% de identidad	44,4% de identidad
401 YKVTQDELK 1 YVVMDECK * * * *	211 YGYVDFENK 1 YVVMDECK * * * *	548 YQLSVDEAK 1 YVVMDECK * * * *
410 NLPYKVTQDELKEVF .: :.: : ---YVVMDECK---	210 220 SRGYGYVDFENKSYA .: :.: : ---YVVMDECK---	550 LDGYQLSVDEAKPRD .: :.: : ---YVVMDECK---
c		

Figura 42.- Se muestran los alineamientos de los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas con las secuencias de las proteínas humana, de levadura y de alfalfa. Los alineamientos expresados con asteriscos fueron obtenidos mediante el programa "SIM", y los expresados con puntos, con el programa lalign. **(a)** Alineamiento del péptido KNEVEEERLK; **(b)** alineamiento con el péptido MTNSNYYPSSK; **(c)** alineamiento con el péptido YVVMDECK.

VII.- ANÁLISIS DE HOMOLOGÍAS ENTRE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS NUCLEOLINA Y SEMEJANTES A NUCLEOLINA Y SU ESTRUCTURA EN DOMINIOS

Actualmente se conoce la organización estructural de la nucleolina de mamíferos y las secuencias que son responsables de algunos de los dominios funcionales de proteínas semejantes a nucleolina. Con estos datos y con el alineamiento de secuencias, podríamos obtener la organización estructural y funcional en la estructura primaria de cada proteína, así como dilucidar el grado de identidad entre las proteínas presumiblemente homólogos. Por consiguiente, hemos analizado las diferentes proteínas agrupadas, primeramente, por grupos taxonómicos.

1. Análisis entre mamíferos

Para conocer el grado de similitud existente entre las proteínas secuenciadas en distintas especies (rata, ratón, hámster y humano) se realizó un alineamiento de las secuencias. Para el análisis de la afinidad de las secuencias se utilizó el programa "Clustal-W". El alineamiento de las secuencias de estas proteínas mostró una identidad total del 77,1%, un 10,62% de alta identidad, un 4,97% de débil identidad y unas diferencias del 7% (figura 43a). Estos datos reflejan la existencia de una gran homología entre las distintas proteínas y lo conservada que se encuentra entre organismos.

El alineamiento de las cuatro proteínas nos ha permitido establecer la estructura modular en tres dominios funcionales como había sido descrito para la nucleolina de mamíferos (Lapeyre *et al.*, 1987). En el dominio amino terminal se localizan cuatro unidades caracterizadas, por contener residuos de serina con grupos ácidos (Asp y Glu) (Ac/Ser). En los cuatro caso, la señal de localización nuclear (SLN) se sitúa a continuación de este dominio, seguida de las cuatro regiones de unión a RNA y en el extremo carboxi terminal, el dominio GAR. Esto ha permitido el diseño de un modelo estructural común a las cuatro proteínas en el que se representa la localización y tamaño de cada módulo (figura 43b).

a

	10	20	30	40	50	60
<i>R. norvegicus</i>	VKLAKAGKTHG	ESKKMAPPPKEVE	EDSEDEEMSEDE	-DSSGHEEVVI	PQKKGKATTP	
<i>M. musculus</i>	VKLAKAGKTHG	EAKKMAPPPKEVE	EDSEDEEMSEDE	-DSSGHEEVVI	PQKKGKATTP	
<i>M. auratus</i>	VKLAKAGKTHG	EAKKMAPPPKEVE	EDSEDEEMSEDE	-DSSGHEEVVI	PQKKGKATTP	
<i>H. sapiens</i>	VKLAKAGKTHG	EAKKMAPPPKEVE	EDSEDEEMSEDE	-DSSGHEEVVI	PQKKGKAAATS	
	70	80	90	100	110	120
<i>R. norvegicus</i>	AKKVVVSQT	KAAPVTPAKKA	AVTPGKKA	AATPAKKA	AVTPAKV	VPTPGKKGAAQAKALVP
<i>M. musculus</i>	AKKVVVSQT	KAAPVTPAKKA	AVTPGKKA	AVTPAKK	AVTPAKV	VPTPGKKGAAQAKALVP
<i>M. auratus</i>	AKKVVVSQT	KAAPVTPAKKA	AVTPGKKA	AVTPAKK	AVTPAKV	VPTPGKKGAAQAKALVP
<i>H. sapiens</i>	AKKVVVSPT	KKVAVATPAKKA	AVTPGKKA	AATPAKKT	VTTPAKA	VTPGKKGATPGKALVA
	130	140	150	160	170	180
<i>R. norvegicus</i>	TPGKKGA	AVTPAKGA	KNGKNAK	EDSD	EDDED	-EDSDDED--EDEFEP
<i>M. musculus</i>	TPGKKGA	AVTPAKGA	KNGKNAK	EDSD	EDDED	-EDSDDED--EDEFEP
<i>M. auratus</i>	TPGKKGA	AVTPAKGA	KNGKNAK	EDSD	EDDED	-EDSDDED--EDEFEP
<i>H. sapiens</i>	TPGKKGA	AVTPAKGA	KNGKNAK	EDSD	EDDED	-EDSDDED--EDEFEP
	190	200	210	220	230	240
<i>R. norvegicus</i>	AKAAPAAP	PASEDE	DEEDDD	DEDDDD	DEEEED	DEEVEITPAK
<i>M. musculus</i>	AKAAPAAP	PASEDE	DEEDDD	DEDDDD	DEEEED	DEEVEITPAK
<i>M. auratus</i>	AKAAPAAP	PASEDE	DEEDDD	DEDDDD	DEEEED	DEEVEITPAK
<i>H. sapiens</i>	AKAAPAAP	PASEDE	DEEDDD	DEDDDD	DEEEED	DEEVEITPAK
	250	260	270	280	290	300
<i>R. norvegicus</i>	KVAEED	DEEDDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE
<i>M. musculus</i>	KVAEED	DEEDDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE
<i>M. auratus</i>	KVAEED	DEEDDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE
<i>H. sapiens</i>	KVAEED	DEEDDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE	DEDEDE
	310	320	330	340	350	360
<i>R. norvegicus</i>	APFAKQK	QKVEG	SEPTTP	PNLFI	GNLNP	NKSVARL
<i>M. musculus</i>	APFAKQK	QKVEG	SEPTTP	PNLFI	GNLNP	NKSVARL
<i>M. auratus</i>	APFAKQK	QKVEG	SEPTTP	PNLFI	GNLNP	NKSVARL
<i>H. sapiens</i>	APFAKQK	QKVEG	SEPTTP	PNLFI	GNLNP	NKSVARL
	370	380	390	400	410	420
<i>R. norvegicus</i>	GYVDFESA	EDLEKALE	LTGLKVP	ONEIKLE	KPKGR	DSKKVRA
<i>M. musculus</i>	GYVDFESA	EDLEKALE	LTGLKVP	ONEIKLE	KPKGR	DSKKVRA
<i>M. auratus</i>	GYVDFESA	EDLEKALE	LTGLKVP	ONEIKLE	KPKGR	DSKKVRA
<i>H. sapiens</i>	GYVDFESA	EDLEKALE	LTGLKVP	ONEIKLE	KPKGR	DSKKVRA
	430	440	450	460	470	480
<i>R. norvegicus</i>	KEVFEDA	VEIRLVS	QDGRSK	GIAYIE	FPKSEAD	AEKNLEEK
<i>M. musculus</i>	KEVFEDA	VEIRLVS	QDGRSK	GIAYIE	FPKSEAD	AEKNLEEK
<i>M. auratus</i>	KEVFEDA	VEIRLVS	QDGRSK	GIAYIE	FPKSEAD	AEKNLEEK
<i>H. sapiens</i>	KEVFEDA	VEIRLVS	QDGRSK	GIAYIE	FPKSEAD	AEKNLEEK
	490	500	510	520	530	540
<i>R. norvegicus</i>	RQE-RTG	KNSTW	GESKTL	VLSNLS	YSATEE	TLQEVFE
<i>M. musculus</i>	RQE-RTG	KNSTW	GESKTL	VLSNLS	YSATEE	TLQEVFE
<i>M. auratus</i>	RQE-RTG	KNSTW	GESKTL	VLSNLS	YSATEE	TLQEVFE
<i>H. sapiens</i>	RQE-RTG	KNSTW	GESKTL	VLSNLS	YSATEE	TLQEVFE
	550	560	570	580	590	600
<i>R. norvegicus</i>	FASFEDA	KEALNS	CNKMEI	EGRTIR	LELQ	PRGSP
<i>M. musculus</i>	FASFEDA	KEALNS	CNKMEI	EGRTIR	LELQ	PRGSP
<i>M. auratus</i>	FASFEDA	KEALNS	CNKMEI	EGRTIR	LELQ	PRGSP
<i>H. sapiens</i>	FASFEDA	KEALNS	CNKMEI	EGRTIR	LELQ	PRGSP

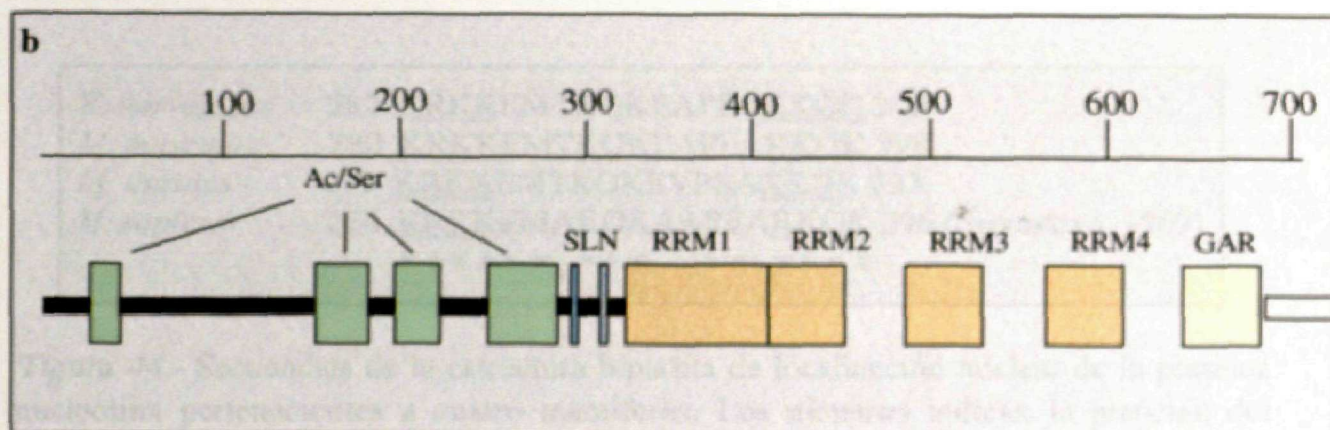
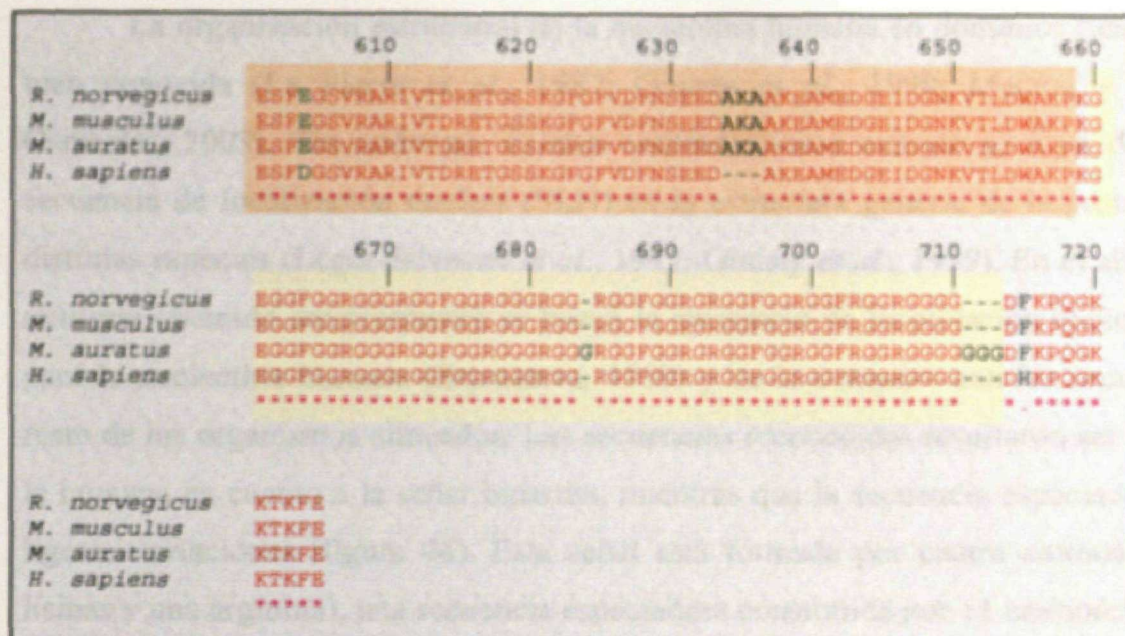


Figura 43.- (a) Representación de la alineación de las secuencias de aminoácidos de la proteína de algunos mamíferos: rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), hamster (*Mesocricetus auratus*) y humano (*Homo sapiens*). Los asteriscos representan la identidad entre los aminoácidos, que se muestran en rojo, los dos puntos indican los aminoácidos conservados, y se representan en verde, y el punto muestra los aminoácidos semiconservados, en color azul; los que no muestran ninguna identidad se representan en negro. Los dominios están representados por cajas, en verde claro, las cuatro secuencias ácidas, alternadas con secuencias básicas, seguidas, en azul, de la señal bipartita de localización nuclear; en marrón claro, las cuatro regiones de unión a RNA, y el último dominio, en amarillo, la región GAR. El alineamiento se realizó mediante el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) disponible en el servidor NPS@ (Network Protein Sequence @analysis) (Combet *et al.*, 2000) con URL <http://npsa-pbil.ibcp.fr/> que es la parte dedicada al análisis de proteínas del PBIL (Pôle Bio-Informatique Lyonnais) disponible en la URL <http://pbil.univ-lyon1.fr/>

(b) Representación esquemática, por dominios, de la secuencia de aminoácidos. La barra calibrada representa el número de aminoácidos.

La organización estructural de la nucleolina humana en dominios funcionales es bien conocida (La Pierre *et al.*, 1987; Ginisty *et al.*, 1999; Medina y González-Camacho, 2003). Sin embargo, existen contradicciones cuando se trata de situar la secuencia de localización nuclear (SLN) en la estructura general de la proteína en las distintas especies (Léger-Silvestre *et al.*, 1997; Ginisty *et al.*, 1999). En el alineamiento múltiple obtenido anteriormente se buscó la secuencia de localización nuclear descrita para la nucleolina humana (Srivastava, 1989) y se la comparó con las secuencias del resto de los organismos alineados. Las secuencias reconocidas resultaron ser idénticas a la humana en cuanto a la señal bipartita, mientras que la secuencia espaciadora mostró ligeras variaciones (figura 44). Esta señal está formada por cuatro aminoácidos (tres lisinas y una arginina), una secuencia espaciadora constituida por 11 aminoácidos, y una segunda secuencia breve de otros 4 aminoácidos (tres lisinas y una glutamina).

<i>R. norvegicus</i>	282	<u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u>	300
<i>M. musculus</i>	280	<u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u>	298
<i>M. auratus</i>	279	<u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u>	297
<i>H. sapiens</i>	278	<u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u>	296 (Srivastava, 1989)
		* * * * * : * * * * . * * * * * *	

Figura 44.- Secuencias de la estructura bipartita de localización nuclear de la proteína nucleolina pertenecientes a cuatro mamíferos. Los números indican la posición del primer y último aminoácido de cada secuencia. Los asteriscos muestran los aminoácidos que presentan identidad, los dos puntos, aminoácidos conservados y el punto los semiconservados, los que presentan diferencias absolutas se muestran sin representación simbólica. Los aminoácidos subrayados son aquellos que forman parte de la estructura bipartita y los no subrayados pertenecen a la secuencia espaciadora.

2. Análisis con el resto de cordados y el protozoo

La nucleolina de mamíferos responde al esquema descrito para humanos. Esta conclusión se obtiene de los resultados de similitud, que muestran un porcentaje de identidad del 93%. No obstante, al comparar las nucleolinas de mamíferos con el resto de proteínas semejantes a nucleolina en otros vertebrados, no está clara ni la identidad ni la estructura exacta, aunque su organización en tres dominios siempre se mantiene.

Como en el caso anterior, se procedió a realizar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de todos los vertebrados disponibles y la localización y esquematización de los dominios basado en los dominios ya conocidos de la nucleolina de mamíferos. Los resultados de este análisis muestran que el dominio GAR, las regiones de unión a RNA y la secuencia de localización nuclear (SLN) prácticamente no contienen variaciones en cuanto a su situación dentro de la estructura primaria de la proteína. Es el dominio amino terminal el que sufre algunas modificaciones. El gallo mantiene el mismo esquema que los mamíferos, a diferencia de la carpa y el anfibio. En la carpa se localizaron seis secuencias Ac/Ser: cuatro de ellas son idénticas a las de los modelos anteriores y las dos nuevas se intercalan entre la primera y la segunda correspondientes al modelo de mamíferos. En el caso de *Xenopus*, sólo presenta una secuencia añadida al modelo de mamíferos, también situada entre la primera y la segunda de este modelo, y que se alinea con la segunda añadida de carpa (figura 45).

La SLN descrita para el gallo (Schmidt-Zachmann y Nigg, 1993) se alinea con la de la proteína humana, y con las propuestas para el resto de los mamíferos. Este alineamiento nos permite predecir estas secuencias para la carpa y *Xenopus*. En ambos casos se trata de una estructura bipartita, en la que los cuatro primeros aminoácidos del anfibio son idénticos al resto de vertebrados, la región separadora contiene dos menos que en mamíferos, y de los cuatro últimos aminoácidos, la glutamina de mamíferos cambia por una treonina. En la carpa se mantiene el número de aminoácidos totales de la estructura, aunque también cambia ligeramente su composición: de los cuatro primeros, el último cambia una lisina por una alanina, y de los cuatro últimos, cambia una glutamina por una alanina (figura 46).

Siguiendo la misma estrategia para la ascidia y el protozoo, se observaron cambios más profundos. El protozoo no presenta ni el dominio GAR, ni la SLN y el dominio central sólo está formado por dos secuencias de unión a RNA. El dominio amino terminal mantiene las cuatro regiones Ac/Ser que contiene la nucleolina de mamíferos, a las que se le suman tres secuencias más. La ascidia contiene dos regiones GAR, una de ellas situada entre las dos regiones de unión a RNA que forman el dominio central. La secuencia de localización nuclear se sitúa entre el dominio central y el amino terminal y mantiene la estructura bipartita de todos los casos vistos hasta el momento (figura 45). De los cuatro primeros aminoácidos que forman la SLN, al igual que en la carpa, cambia una lisina por una alanina, con respecto a los vertebrados; y en la segunda parte de la estructura bipartita, cambia el tercer aminoácido, una glutamina



Figura 45.- Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas pertenecientes a cordados y procordados. En verde se muestran las regiones Ac/Ser, en azul la secuencia de localización nuclear (SLN), en marrón las de unión a RNA (RRM) y en amarillo el dominio GAR. Las líneas verticales conectan las secuencias Ac/Ser que aparecen juntas en el alineamiento múltiple. N-t: extremo amino terminal; C-t: extremo carboxilo terminal. La barra horizontal expresa la distancia en número de aminoácidos.

por una alanina (figura 46). En cuanto al dominio N-terminal, está formado por dos regiones Ac/Ser, de las que la primera se alinea con la segunda de vertebrados, y la segunda contiene la suma de las secuencias tercera y cuarta de vertebrados (figura 45).

<i>C. carpio</i>	245	<u>KRK</u> AEA K KE KG T PPAKKAK	263
<i>X. laevis</i>	205	<u>KRK</u> KEM P KT I - - PEAKKT K	221
<i>G. gallus</i>	253	<u>KRK</u> KEMA N - KS A PEAKKKK	270 (Schmidt- Zachmann y Nigg, 1993)
		* * * * *	
<i>C. intestinalis</i>	166	<u>KRK</u> ATETEEVAT KKVK	181

Figura 46.- Secuencias de la estructura bipartita de localización nuclear de la proteína nucleolina pertenecientes a tres cordados y un procordado. Los números indican la posición del primer y último aminoácido de cada secuencia. Los asteriscos muestran los aminoácidos que presentan identidad absoluta. Los aminoácidos subrayados son aquellos que forman parte de la estructura bipartita, y los no subrayados pertenecen a la secuencia espaciadora.

3. Análisis de homologías entre las distintas proteínas semejantes a nucleolina de plantas y su estructura en dominios

De manera semejante a los casos anteriores, se ha analizado la estructura de las proteínas semejantes a nucleolina en plantas. Para ello, basándonos en la predicción de dominios, hemos diseñado un esquema para cada proteína, en el que se ha identificado cada dominio y sobre el cual se ha realizado la comparación y obtención de datos. Se utilizaron dos estrategias básicas para la predicción: la primera está fundamentada en la identidad existente entre las distintas proteínas y la segunda en la localización de la secuencia de los dominios a partir de dominios conocidos en otras proteínas y depositados en bases de datos (SMM, PDB).

Al igual que en los casos anteriores se realizó el alineamiento de las secuencias de las proteínas conocidas (figura 47). El resultado entre el guisante, la alfalfa y el tabaco fue de una identidad absoluta del 39%, un 29% de similitud y unas diferencias del 32%. Al introducir *Arabidopsis* en el alineamiento, las diferencias aumentaban hasta el 47,7%, mientras que si sólo alineamos alfalfa y guisante (especies de la misma familia), las diferencias son del 17%.

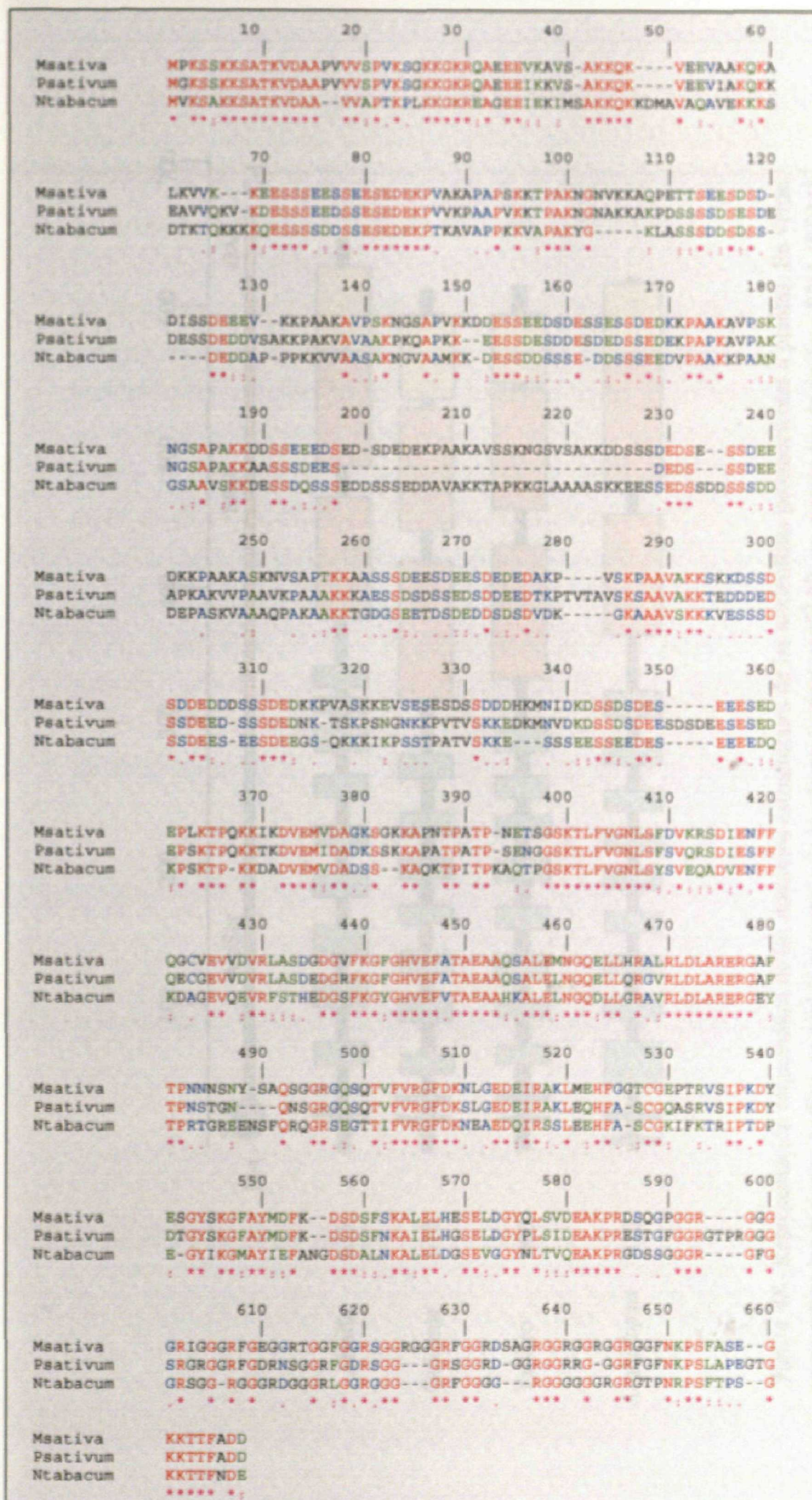


Figura 47.-- Representación del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la nucleolina de la alfalfa (*Medicago sativa*), el guisante (*Pisum sativum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los asteriscos representan la identidad entre los aminoácidos, que se muestran en rojo, los dos puntos indican los aminoácidos conservados, y se representan en verde, y el punto muestra los aminoácidos semiconservados, en color azul. Los aminoácidos que no muestran ninguna identidad se representan en negro.

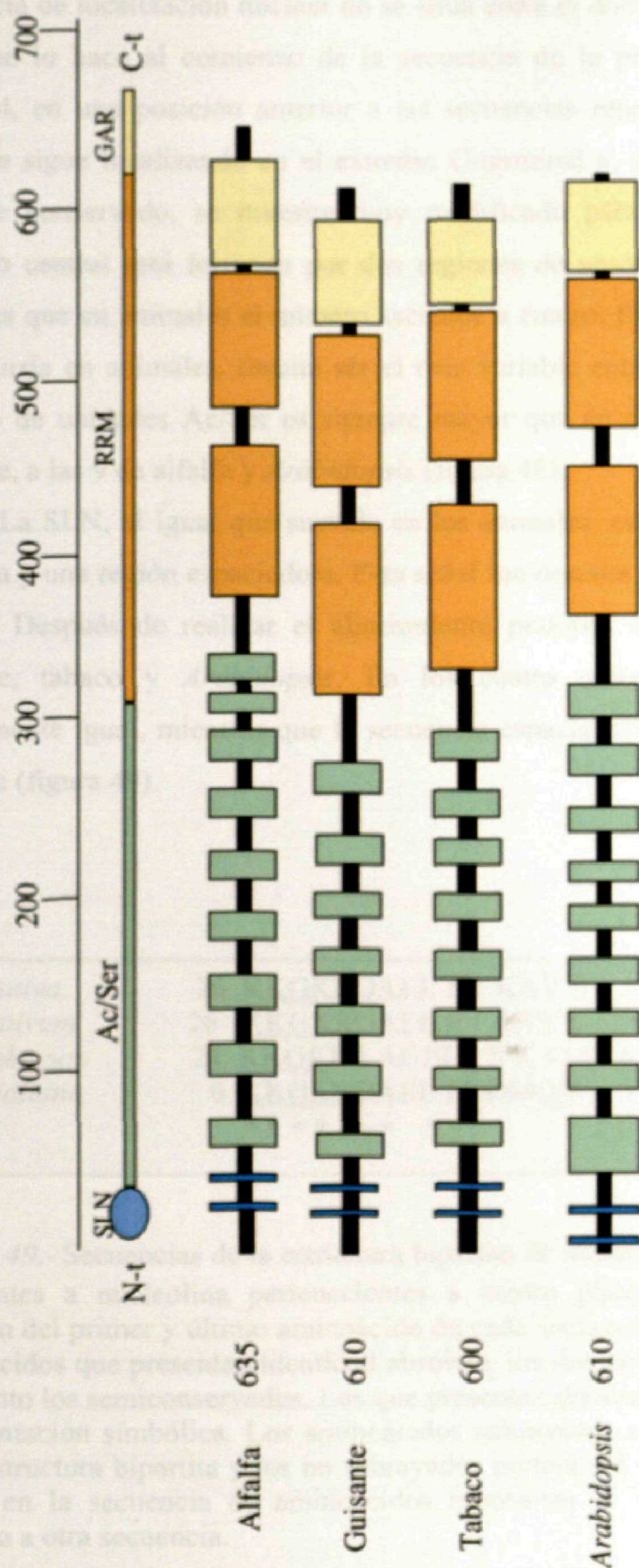


Figura 48. - Representación esquemática de los dominios estructurales de las nucleolinas pertenecientes a plantas. En verde se muestran las regiones Ac/Ser, en azul la secuencia de localización nuclear (SLN), en marrón las de unión a RNA (RRM) y en amarillo el dominio GAR. N-t: extremo amino terminal; C-t: extremo carboxilo terminal. La barra horizontal expresa la distancia en número de aminoácidos. El número junto al organismo representará el número de aminoácidos que tiene la proteína de esa especie en particular.

En plantas el esquema cambia respecto de lo que ocurre en animales. La secuencia de localización nuclear no se sitúa entre el dominio N-terminal y C-terminal, sino que lo hace al comienzo de la secuencia de la proteína, en el extremo amino terminal, en una posición anterior a las secuencias repetidas de Ac/Ser. El dominio GAR se sigue localizando en el extremo C-terminal y, aunque en general permanece bastante conservado, se muestra muy modificado para el caso de *Arabidopsis*. El dominio central está formado por dos regiones de unión a RNA en todos los casos, mientras que en animales el número asciende a cuatro. El dominio N-terminal, al igual que ocurría en animales, resulta ser el más variable entre las plantas. No obstante, el número de unidades Ac/Ser es siempre mayor que en animales, y va de las siete en guisante, a las 9 de alfalfa y *Arabidopsis* (figura 48).

La SLN, al igual que sucedía en los animales, está formada por una estructura bipartita y una región espaciadora. Esta señal fue descrita para la alfalfa por Tong *et al.*, (1997). Después de realizar el alineamiento pudimos deducir la correspondiente al guisante, tabaco y *Arabidopsis*. En los cuatro casos, la estructura bipartita es exactamente igual, mientras que la secuencia espaciadora, en estos casos es altamente variable (figura 49).

<i>M. sativa</i>	26	<u>KKGKR</u> QAEE EV KAV S – <u>AKKQK</u> 45
<i>P. sativum</i>	26	<u>KKGKR</u> QAEE E I KKV S – <u>AKKQK</u> 45(Tong <i>et al.</i> , 1997)
<i>N. tabacum</i>	24	<u>KKGKRE</u> AGEE I E K I MS <u>AKKQK</u> 44
<i>A. thaliana</i>	6	<u>KKGKR</u> DAEE DLDMQV – <u>TKKQK</u> 26
		*****: * *: : . : *****

Figura 49.- Secuencias de la estructura bipartita de localización nuclear de las proteínas semejantes a nucleolina pertenecientes a cuatro plantas. Los números indican la posición del primer y último aminoácido de cada secuencia. Los asteriscos muestran los aminoácidos que presentan identidad absoluta, los dos puntos aminoácidos conservados y el punto los semiconservados. Los que presentan diferencias absolutas se muestran sin representación simbólica. Los aminoácidos subrayados son aquellos que forman parte de la estructura bipartita y los no subrayados pertenecen a la secuencia espaciadora. El guión, en la secuencia de aminoácidos representa la falta de alguno de ellos con respecto a otra secuencia.

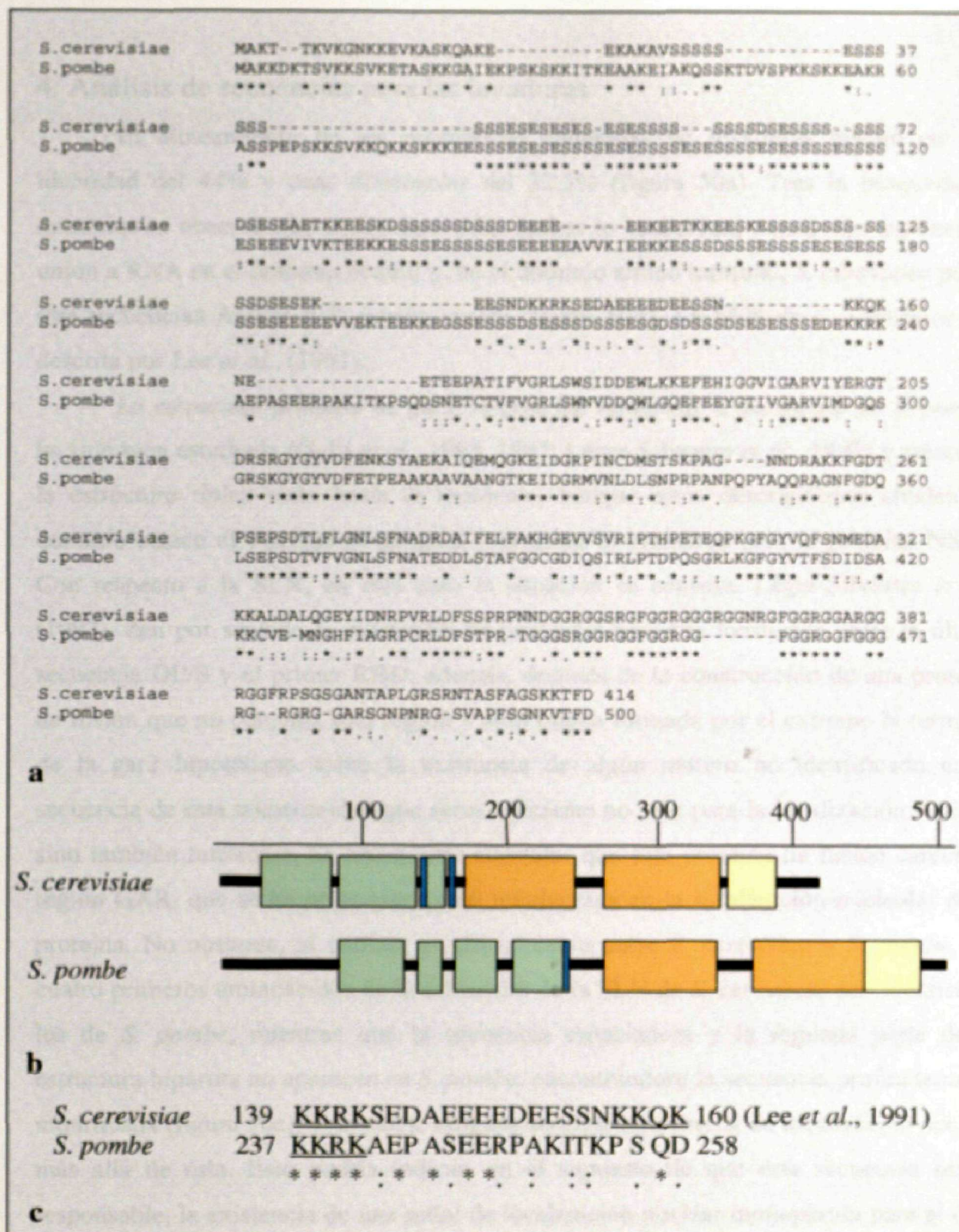


Figura 50.- Resultados obtenidos a partir de las secuencias de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. **(a)** Alineamiento de las secuencias. **(b)** Organización en dominios, en la estructura primaria de las proteínas; en verde las secuencias Ac/Ser, en azul la señal de localización nuclear, en marrón las secuencias de unión a RNA y en amarillo el dominio GAR. Las secuencias de aminoácidos que no pertenecen a ninguno de estos dominios se muestran en negro; la barra horizontal numerada muestra las distancias en aminoácidos. **(c)** Secuencias alineadas de la región de localización nuclear. Los aminoácidos subrayados forman la estructura bipartita, o monopartita, de la secuencia; los asteriscos y los puntos muestran el grado de similitud entre aminoácidos de las distintas secuencias y los números indican los aminoácidos entre los que están comprendidas las secuencias.

4. Análisis de secuencias para las levaduras

El alineamiento de las nucleolinas conocidas de levaduras resultó en una identidad del 44% y unas diferencias del 32,3% (figura 50a). Tras la búsqueda de dominios se observó que el dominio GAR ambas lo conservan; tienen dos regiones de unión a RNA en el dominio central y, en el dominio amino terminal, *S. cerevisiae* posee tres secuencias Ac/Ser y *S. pombe* cuatro (figura 50b). La SLN de *S. cerevisiae* fue descrita por Lee *et al.*, (1991).

La estructura primaria de gar2, la proteína semejante a nucleolina en *S. pombe*, ha sido bien estudiada (Gulli *et al.*, 1995, 1997; Léger-Silvestre *et al.*, 1997) y mantiene la estructura típica vista hasta el momento, aunque estas descripciones añaden un dominio básico al extremo N-terminal y también lo proponen para la proteína NSR1. Con respecto a la SLN, en este caso la situación es confusa. Léger-Silvestre *et al.*, (1997), dan por sentado la existencia de una señal bipartita localizada entre la última secuencia DE/S y el primer RBD; además, después de la construcción de una proteína de fusión que no contenía esta región y sólo estaba formada por el extremo N-terminal de la gar2 hipotetizan sobre la existencia de algún motivo² no identificado en la secuencia de esta construcción que sería suficiente no sólo para la localización nuclear, sino también nucleolar. Es interesante constatar que esta proteína de fusión carece de región GAR, que se ha propuesto como involucrada en la localización nucleolar de la proteína. No obstante, al realizar el alineamiento entre *S. cerevisiae* y *S. pombe*, los cuatro primeros aminoácidos de la estructura de la SLN de *S. cerevisiae* son idénticos a los de *S. pombe*, mientras que la secuencia espaciadora y la segunda parte de la estructura bipartita no aparecen en *S. pombe*, encontrándose la secuencia profundamente modificada (figura 50c), y no existe ninguna secuencia potencial de localización nuclear más allá de ésta. Esto podría indicar, en el supuesto de que esta secuencia sea la responsable, la existencia de una señal de localización nuclear monopartita para el caso de *S. pombe*, y nunca bipartita. A falta de datos experimentales, el estudio detallado de la secuencia de aminoácidos basados en secuencias conocidas, muestra la existencia de una serie de secuencias en el dominio N-terminal, que podrían ser responsables de su localización nuclear.

3 KKDK 6
 52 KSK 55
 72 KKQK 75
 75 KSK 78
 52 KSKKEAKRASSPEPSKKSSVKKQK 75

Tabla 4.- Secuencias de aminoácidos en *S. pombe* potenciales de localización nuclear.

En la estructura bipartita, la secuencia KKQK es compartida por plantas, mamíferos y NSR1. En cualquier caso, cualquiera de estas secuencias son candidatas a ser la SLN y se encuentran en el extremo N-terminal, formando parte del mutante construido por Léger-Silvestre *et al.*, (1997).

5. Análisis filogenético de la nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina

La alta identidad de las distintas proteínas en cuanto a su estructura primaria, la presencia de los mismos dominios en todas ellas y la misma situación de éstos en la estructura primaria de cada grupo de organismos, hace pensar en la existencia de un ancestro común a todas ellas, por lo que se trataría de proteínas homólogas. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis filogenético de las quince especies de las que se conoce la secuencia completa de aminoácidos de sus nucleolinas.

Para ello se procedió al alineamiento de las secuencias de todas ellas mediante el programa CLUSTAL-W, que permite el alineamiento múltiple, seguido de la realización del árbol filogenético y la corrección de las distancias mediante el algoritmo "Jukes-Cantor Distance".

El árbol generado de esta manera se muestra en la figura 51 y emparenta a los diferentes organismos de la misma manera que, con los conocimientos actuales, se cree que están relacionados. Es notable que el estudio de una sola proteína produzca una representación tan exacta de la filogenia de 15 organismos tan diversos como los mostrados aquí, lo que muestra que las secuencias de aminoácidos de las proteínas almacenan una considerable información evolutiva. Esto viene a confirmar la hipótesis de que todas las proteínas estudiadas aquí proceden de genes descendientes de un gen ancestral que estaba presente en la especie originaria de la cual las especies en cuestión

han evolucionado. Esto hace suponer que las moléculas de la nucleolina son proteínas que evolucionan lentamente. Organismos tan diferentes como el hombre y las levaduras tienen en común una gran proporción de aminoácidos de sus moléculas. La conservación evolutiva de esta proteína hace posible el estudio de las diferencias genéticas entre organismos que están sólo remotamente emparentados.

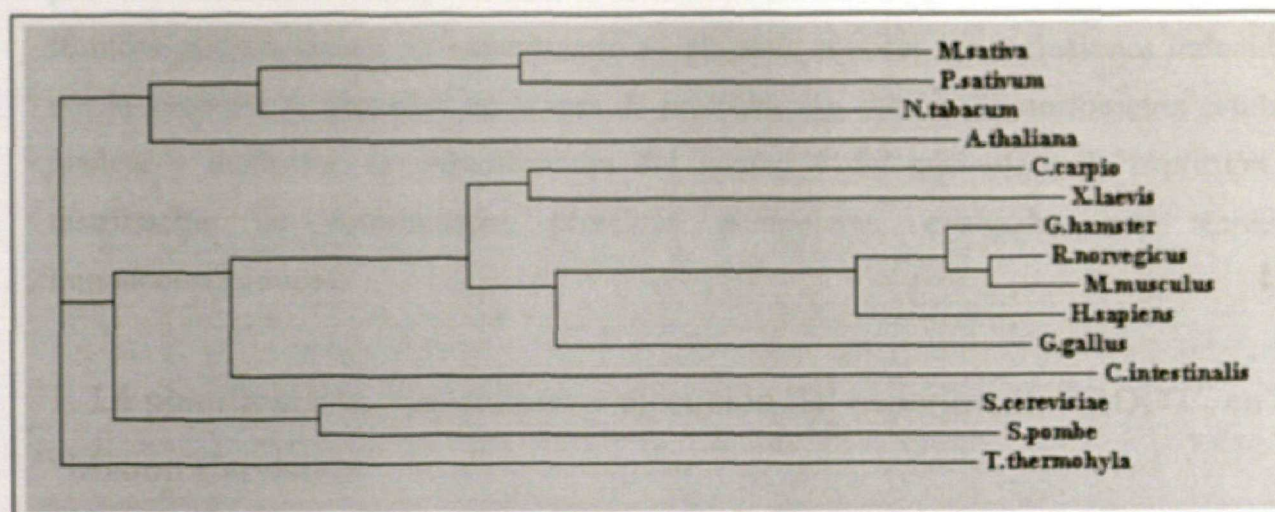


Figura 51:- Árbol filogenético generado a partir de las secuencias de aminoácidos de una proteína, la nucleolina, presente en 15 organismos diferentes. El árbol muestra una agrupación de organismos en sintonía con la organización de los seres vivos, tal como se propone en la actualidad.

VIII.- LAS PROTEÍNAS NUCLEOLARES Y EL CICLO CELULAR EN AUSENCIA DE GRAVEDAD

Las células vegetales han sido objeto de una parte considerable de los estudios de Biología Espacial realizados hasta el momento. Se ha demostrado de manera inequívoca que la alteración de las condiciones de gravedad de las plantas produce una significativa reorganización de su patrón de expresión génica (Moseyko *et al.*, 2002). Sin embargo, el objetivo de la inmensa mayoría de los experimentos ha sido el análisis de los gravitropismos de raíces y tallos, es decir, los mecanismos que funcionan en la Tierra para dirigir el crecimiento de las raíces en el sentido de la gravedad y el de los tallos en sentido opuesto, que, lógicamente, presentan evidentes alteraciones en ausencia de gravedad (Legué *et al.*, 1996; Kiss, 2000). Existen pocos trabajos sobre el ciclo celular de las células vegetales y su regulación en estas condiciones, y lo cierto es

que los datos obtenidos no están totalmente de acuerdo unos con otros (Kordyum, 1997).

Con estos antecedentes y con estas motivaciones hemos participado en la "Misión Cervantes" con un experimento, conocido por su acrónimo "Root", consistente en la germinación de semillas de *Arabidopsis* en ambiente espacial y la fijación de las plántulas resultantes para posibilitar el estudio de las células proliferantes de la raíz por técnicas microscópicas. El experimento se propone conocer las variaciones inducidas por la ausencia de gravedad en la tasa de proliferación celular, la morfometría celular, nuclear y nucleolar, la ultraestructura del núcleo y del nucleolo y la expresión y distribución de determinadas proteínas nucleolares, evaluadas con técnicas inmunocitoquímicas.

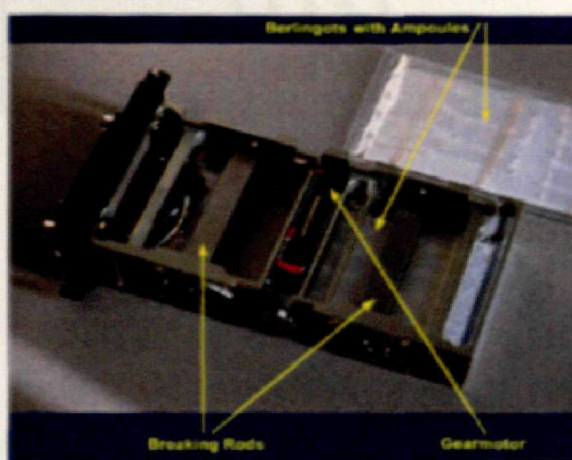
1. La planificación, preparación y ejecución del experimento "ROOT" en la "Misión Cervantes"

Para la puesta a punto del experimento se utilizaron dos biocontenedores. Por cuestiones de seguridad relacionadas con el uso de sustancias tóxicas volátiles (paraformaldehído), se tuvo que utilizar una versión monitorizada de un modelo preexistente, "Antibio", desarrollado por el grupo de Dr. Gilbert Gasset (GSMBS-CNES, Toulouse, Francia). Esta segunda versión se denomina MAMBA (*Motorized Ampoule Breaker Assembly*) y fue desarrollado por Dutch Space B.V. Cada MAMBA contiene dos bolsas de doble pared termoselladas denominadas *Berlingots*. Cada una de estas bolsas contiene un soporte físico para las semillas, en este caso papel de filtro, una carga de 30 semillas de *Arabidopsis* y una batería de ampollas que almacenan los líquidos necesarios para el desarrollo del experimento. Cada ampolla contenía aproximadamente 30 μL , en unos casos de medio de cultivo, y en otros del fijador (paraformaldehído al 6%).

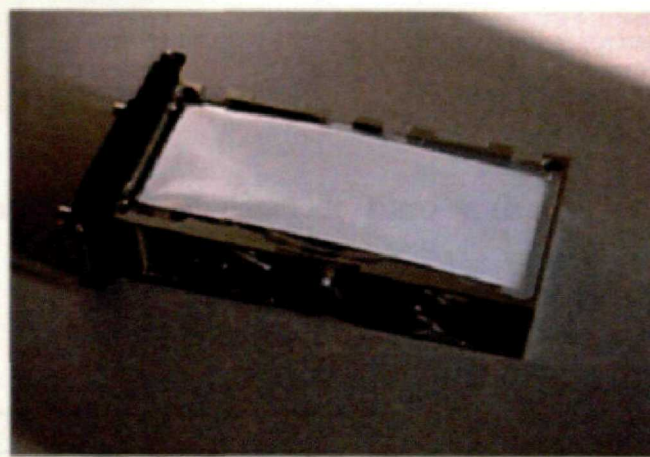
La ruptura de las ampollas se efectúa mediante un motor que es activado desde el exterior del contenedor. El motor mueve unas levas internas que provocan la fractura de las ampollas y la liberación de los líquidos deseados. La activación del proceso biológico se consigue tras la ruptura de las ampollas que contiene el medio de cultivo que será atrapado por el papel de filtro que contienen las semillas. Transcurridos cuatro días, se activa de nuevo el motor para producir la ruptura de las ampollas que contienen el fijador, deteniendo el desarrollo de las plántulas en el momento deseado.

La energía necesaria para la activación del motor del MAMBA es suministrada por una fuente de alimentación especialmente construida para este fin.

El experimento así diseñado fue activado por el astronauta español Pedro Duque en la Estación Espacial Internacional y las muestras fueron recogidas y procesadas por nosotros tras el aterrizaje, llevándose a cabo los estudios post-vuelo en nuestro laboratorio de Madrid.

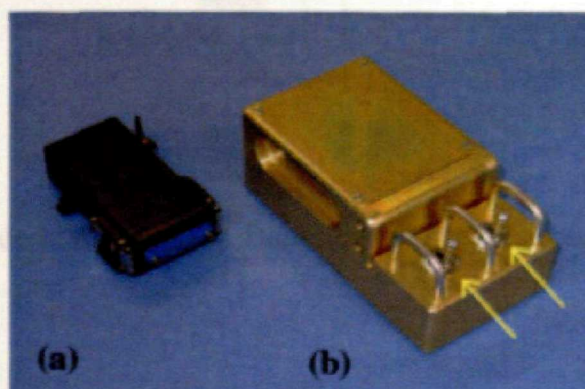


(a)



(b)

Figura 52.- Parte interna del MAMBA. (a) Detalle de la maquinaria interna. Levas (*Breaking rods*), palanca que activa el motor (*Gearmotor*). (b) MAMBA, con un *Berlingot* en su interior.



(a)

(b)

Figura 53.- (a) Imagen del MAMBA y (b) la Fuente de Alimentación. Las flechas amarillas indican los interruptores que accionan el mecanismo de ruptura de ampollas.

DISCUSIÓN

Para el estudio de un proceso vital esencial, se requiere la observación celular, hechos trabajados con poblaciones celulares activas. Así, de la proliferación, como son las células reproductivas de la raíz de la planta.

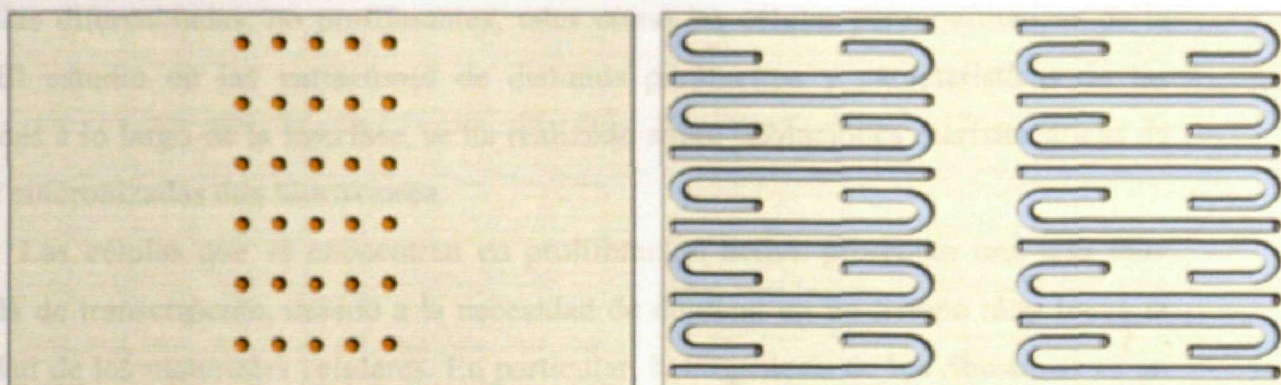


Figura 53.- (a) Disposición de las semillas sobre el papel de filtro y (b) de las ampollas.

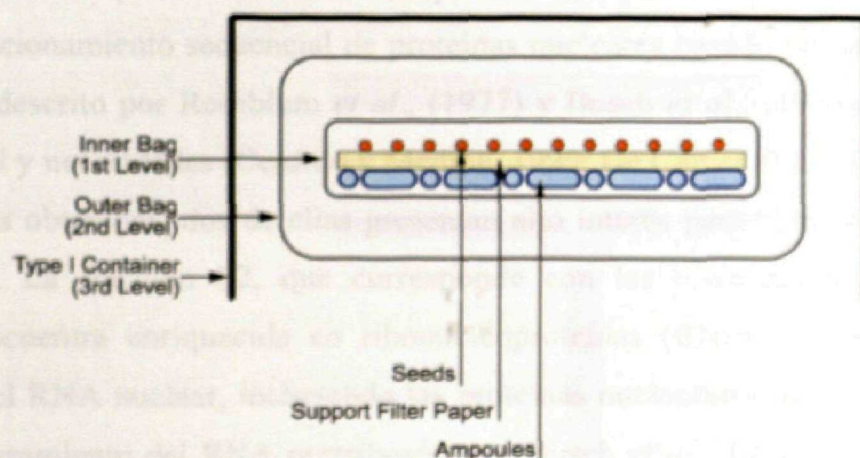


Figura 54.- Esquema de la disposición final de los componentes.

DISCUSIÓN

Para el estudio de un proceso vital esencial, como es la proliferación celular y el ciclo celular, hemos trabajado con poblaciones celulares activas desde el punto de vista de la proliferación, como son las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa*, frente a células diferenciadas, no proliferantes, tales como las células parenquimáticas de la raíz. El estudio de las variaciones de distintos parámetros y características de las proteínas a lo largo de la interfase, se ha realizado sobre poblaciones meristemáticas de la raíz sincronizadas con hidroxiurea.

Las células que se encuentran en proliferación activa presentan una tasa muy elevada de transcripción, debido a la necesidad de duplicar en un tiempo muy breve la totalidad de los materiales celulares. En particular, la biogénesis de los ribosomas es un proceso altamente favorecido en este tipo de células, más que en cualquier otro del organismo. En general, el nivel de ribonucleoproteínas (RNPs) en el núcleo de células proliferantes es excepcionalmente alto. Puesto que las proteínas de interés para nuestros objetivos eran necesariamente RNPs, la primera estrategia a utilizar consistió en conseguir un extracto proteico nuclear enriquecido en RNPs. Para ello se siguió el proceso de fraccionamiento secuencial de proteínas nucleares basado en las diferencias de solubilidad descrito por Rothblum *et al.*, (1977) y Busch *et al.*, (1978), adaptado a nuestro material y necesidades (Cerdido y Medina, 1995; De Cárcer *et al.*, 1997). De las cinco fracciones obtenidas, dos de ellas presentan alto interés para nuestros propósitos experimentales. La fracción S2, que corresponde con las proteínas nucleares más solubles, se encuentra enriquecida en ribonucleoproteínas (RNPs) implicadas en el metabolismo del RNA nuclear, incluyendo las proteínas nucleolares involucradas en la síntesis y procesamiento del RNA prerribosómico (Busch *et al.*, 1978; Bourbon *et al.*, 1983; Dunham y Bryant, 1983; Schnapp *et al.*, 1990; Cerdido y Medina, 1995). La segunda fracción de interés es la insoluble, que corresponde con la matriz nuclear (He *et al.*, 1990), formada mayoritariamente por filamentos intermedios que forman parte del *core* interno de la matriz nuclear (Fey *et al.*, 1986). La importancia de esta segunda fracción se debe a que la matriz nuclear se ha caracterizado como el soporte estructural de los procesos metabólicos que ocurren en el núcleo (Moreno Díaz de la Espina, 1995) y, por otra parte, a que estábamos interesados en descubrir un hipotético intercambio entre formas solubles e insolubles de las proteínas, en relación con cambios funcionales de la célula.

Caracterización de los patrones proteicos en poblaciones meristemáticas y no meristemáticas.

Con el fin de identificar y caracterizar estas proteínas relativas a los mecanismos de proliferación celular y progresión del ciclo celular, se realizó una comparación entre el patrón de proteínas obtenido de células meristemáticas y de células diferenciadas. Las variaciones encontradas en cuanto a la carga de proteína que contienen estos dos tipos celulares son evidentes y podrían ser debidas, precisamente, al estado proliferativo en el que se encuentren. En otros tipos celulares se han localizado en el extracto S2 una serie de proteínas que dependen de esta situación, como son la nucleolina (Bugler *et al.*, 1982), la caseína quinasa nucleolar (CKII) (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987) y factores de transcripción asociados a la RNA polimerasa I (Schnapp *et al.*, 1990). Dentro de este conjunto de proteínas se encuentran la fibrilarina (Cerdido y Medina, 1995), la NopA100 y NopA64 (De Carcer *et al.*, 1997).

Los extractos S2 en geles SDS-PAGE de poblaciones meristemáticas presentan 26 bandas, mientras que en no meristemáticas el número se reduce a 18. Estos datos se muestran mucho más evidentes cuando se trata de proteínas separadas por IEF/SDS-PAGE, donde se detectaron 384 y 209 *spots* en muestras meristemáticas y no meristemáticas respectivamente. De entre ellos, sólo 129 *spots* fueron identificados en ambas muestras y mostraron idénticos pesos moleculares y puntos isoelectrónicos, aunque con frecuencia diferían en cuanto a la intensidad de la tinción entre una muestra y otra. En conjunto, la comparación de los patrones de los geles bidimensionales de ambos tejidos indicó que el 54,9% y el 17,2% de los *spots* fueron específicos para núcleos de células meristemáticas y no meristemáticas, respectivamente, con respecto a un hipotético gel virtual que contuviera el conjunto de los polipéptidos nucleares solubles presentes en células de la raíz, independientemente de su estado proliferativo y de su diferenciación. Los cambios que se producen en las proteínas insolubles son mucho más discretos, pasando de 18 a 12 bandas, en geles monodimensionales, de las muestras meristemáticas a las no meristemáticas, mientras que en los patrones de geles bidimensionales pasan de 88 *spots* en extracto meristemático a 83 en no meristemático.

Las proteínas AgNOR

La técnica de tinción con plata comenzó a ser muy utilizada después de que Goodpasture y Bloom (1975) desarrollaran un procedimiento para detectar el NOR en preparaciones citogenéticas. La tinción AgNOR ha sido, durante mucho tiempo, una

herramienta para investigar la estructura de la cromatina nucleolar y su relación con la función, adaptándose la tinción, posteriormente, para su uso a microscopía electrónica (Bourgeois *et al.*, 1979; Ploton *et al.*, 1982; Moreno *et al.*, 1985). Simultáneamente, con el fin de indagar sobre las proteínas responsables de la tinción, se adaptó del nivel citológico al molecular, para detectar las proteínas separadas electroforéticamente, primero directamente sobre geles (Lischwe *et al.*, 1979) y posteriormente sobre blots (Hozák *et al.*, 1992).

La aplicación más extendida de esta tinción en la actualidad es en la patología humana. Desde que Ploton *et al.* (1986) describieran una modificación de la tinción AgNOR extremadamente simple y reproducible, aplicable a prácticamente cualquier tipo de muestras citohistológicas, la técnica se ha utilizado ampliamente como una herramienta muy común para el diagnóstico y el pronóstico de tumores (Derenzini y Ploton, 1991; Pich *et al.*, 2000). Esto es debido a que la tinción se debe a proteínas que son dependientes de proliferación y se utilizan como marcadores de estos procesos. Además de esto, también ha sido utilizada en otra serie de aplicaciones a nivel citohistológico (Medina *et al.*, 1995 a).

Mediante la modificación de la tinción a *Western blot* se detectaron, por diferentes grupos, dos proteínas principales como las responsables del 60% del total de la tinción, la nucleolina y la B23 (Derenzini *et al.*, 1995; Sirri *et al.*, 1995), aunque se describieron también otras bandas de menor intensidad, a 135, 66, 42, 40 y 29 kDa (Roussel y Hernández-Verdun, 1994; Sirri *et al.*, 2000). Estos ensayos fueron realizados fundamentalmente sobre líneas celulares de mamíferos, más concretamente sobre CHO (Roussel y Hernández-Verdun, 1994) y distintas líneas humanas (Derenzini *et al.*, 1995; Morimoto *et al.*, 2000). Nuestros datos en plantas describen el mismo patrón, aunque con ligeras variaciones en cuanto a los pesos moleculares. Así, la nucleolina de mamíferos presenta un peso molecular de 105 kDa, mientras que la NopA100 lo hace a 100; la B23 está descrita en estos trabajos a 38 y 37 kDa, mientras que en cebolla el doblete se presenta a 45 y 43 kDa; además, la banda correspondiente a 66 kDa, identificada como un fragmento de la nucleolina en células humanas (Sirri *et al.*, 2000), podría tener su correspondencia con la banda de 64 kDa en cebolla, correspondiente con la NopA64. En este contexto, es interesante notar que el patrón bidimensional de proteínas de cebolla obtenido por la tinción AgNOR en nuestro laboratorio es similar (aunque no idéntico) al patrón obtenido por el grupo de Hernández-Verdun en células CHO (Roussel y Hernández-Verdun, 1994). A pesar de las diferencias mostradas en

cuanto al peso molecular entre la B23 de CHO y la de plantas, el rango de punto isoelectrico es prácticamente idéntico. Curiosamente, el peso molecular del doblete de bandas revelado por la tinción AgNOR presumiblemente correspondiente con la proteína B23, difiere incluso entre distintas especies vegetales, como lo demuestran experimentos realizados en nuestro laboratorio con células de alfalfa y *Lepidium* (resultados no publicados). En cualquier caso, se ha puesto en evidencia por primera vez en este trabajo la existencia de una proteína homóloga en plantas a la proteína B23 de mamíferos, una fosfoproteína que desempeña un papel fundamental en el procesamiento tardío del pre-rRNA (Busch, 1978; Olson, 1991). Diversos ensayos inmunoquímicos e inmunocitoquímicos realizados en nuestro laboratorio y en otros, utilizando diferentes anticuerpos heterólogos obtenidos contra la B23 de mamíferos no dieron nunca resultados positivos.

La gran similitud entre los resultados obtenidos por otros grupos en sistemas biológicos de mamíferos y los obtenidos en este trabajo hacen pensar que el grupo de fosfoproteínas asociadas al NOR han permanecido conservadas a lo largo de la evolución. El uso de la tinción AgNOR y el análisis 2-D de proteínas nucleares en diferentes sistemas biológicos puede utilizarse, además de para aportar evidencias sobre la conservación evolutiva de estas proteínas, para identificar marcadores de proliferación celular. Estos marcadores pueden utilizarse para la identificación de células proliferantes, tanto en condiciones normales, como en situaciones donde estos procesos están alterados, dando lugar a estados patológicos del organismo.

Análisis bioquímico de las proteínas NopA100 y NopA64

En trabajos previos en nuestro laboratorio se describieron dos proteínas, NopA100 y NopA64, como proteínas dependientes de proliferación celular, de las que la NopA100 podría corresponder con la homóloga de la nucleolina de mamíferos y la NopA64 con la porción carboxilo terminal de la misma (De Carcer, 1997). Su presencia es mayoritaria en la fracción S2, pero también se encuentran presentes en la matriz nuclear. Existen trabajos que demuestran la presencia de formas solubles e insolubles en proteínas nucleolares; éstas últimas estarían ancladas a la matriz nuclear. La fibrilarina y nucleolina son dos de ellas y se han descrito tanto en mamíferos (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1984; Ochs y Smetana, 1991; Dickinson y Kohwi-Shigematsu, 1995) como en plantas (Cerdido y Medina, 1995; Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1996).

Degradación proteolítica fisiológica de la NopA100

La NopA100 en la fracción soluble de poblaciones meristemáticas muestra un patrón claro mediante *Western blotting*: revela una banda principal a 100 kDa de peso molecular, acompañada de toda una serie de bandas de menor peso molecular y cuantitativamente menos aparentes. Siguiendo este patrón proteolítico a lo largo de la interfase se observa un creciente aumento, tanto en el número de bandas como en la intensidad de las mismas. Así, observamos que en G2 no sólo aumenta la cantidad de la proteína NopA100, sino que también existe un aumento de los productos procedentes de su proteólisis. En consecuencia, podemos concluir que las proteínas que reaccionan con el antisuero comparten epítomos que están presentes en la estructura primaria de la NopA100 y que forman una familia de proteínas inmunológicamente relacionadas, productos de la proteólisis del precursor primario, la NopA100. Este patrón en "escalera", como resultado del *Western blotting*, ha sido descrito con anterioridad para otras nucleolinas (Bourbon *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1991) y podría ser el resultado de un proceso proteolítico controlado, como modificación postraducciona de la banda principal de 100 kDa, asociado a la proliferación celular. Este proceso proteolítico supondría un mecanismo de maduración de la proteína en relación a su actividad.

La maduración proteolítica de la nucleolina ha sido descrita como un mecanismo de autocatálisis por una serie de autores (Bourbon *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1991). Nuestros resultados sobre los procesos de maduración de la NopA100, obtenidos tras el tratamiento con leupeptina, tanto en poblaciones meristemáticas asincrónicas, como en poblaciones sincronizadas, muestran una sensibilidad al inhibidor de forma que se provoca una disminución de la proteólisis, siendo mucho más patente en G2, donde la abundancia cuantitativa de bandas es mucho mayor en condiciones normales. En concreto, en presencia de leupeptina, tres de las bandas, entre ellas la de 100 kDa, muestran sus niveles densitométricos incrementados, lo cual indica una inhibición de la maduración proteolítica. Este resultado demuestra que la mayoría de las proteínas de esta familia son productos de maduración proteolítica y pueden ser derivados de un procesamiento de la proteína *in vivo*, consistente en la degradación específica de la proteína de 100 kDa por una actividad endoproteasa, de una forma similar a lo que se demostró previamente para la nucleolina de mamíferos (Bourbon *et al.*, 1983). No obstante, este mismo grupo observó que la actividad enzimática copurificaba con la proteína sustrato (nucleolina) y propuso la existencia de un dominio en la propia estructura de la proteína con actividad proteasa (tiol proteasa), sensible a la leupeptina,

relacionándose este proceso con la regulación de la transcripción del rDNA (Bouche *et al.*, 1984). Por otra parte, Fang y Yeh (1993) propusieron, para la nucleolina de mamíferos, la existencia de motivos repetidos que sirvieran como lugares de escisión en el proceso de su proteólisis fisiológica.

Esta serie de bandas se ven fuertemente reducidas en poblaciones no meristemáticas, en las que la única banda que aparece con nitidez, aunque en mucha menor proporción que en poblaciones meristemáticas, es la de 100 kDa.

Aunque, como hemos señalado, el patrón proteolítico se ha descrito para algunos modelos biológicos, existen otros organismos donde no aparece en *Western blotting* esta multiplicidad de bandas. Por ejemplo, la nucleolina de *Xenopus laevis* sólo muestra dos o tres bandas (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1989) y la nucMs1 de alfalfa (la homóloga de la nucleolina) presenta una única banda, casi inapreciable en células en fase estacionaria, y dos bandas netas y bien patentes en células en división activa (Bögre *et al.*, 1996).

Todos estos datos nos llevan a pensar que la proteólisis de la NopA100 está en relación directa con su actividad. La proteína madura cuando actúa, habiendo una relación entre el aumento de la actividad del nucleolo (reccionada directamente con la proliferación celular), la actividad de la NopA100 y la degradación proteolítica de ésta.

Fosforilación de la NopA100

El *Western blot* de los geles 2-D con anticuerpo anti-NopA100 produjo información adicional a los SDS-PAGE en cuanto a la relación con la proliferación celular. En particular, hemos encontrado evidencias de diferencias cuantitativas y cualitativas en los dos estados celulares estudiados, que demuestran que la NopA100 es mucho más abundante en células proliferantes que en células no meristemáticas. Los cambios que se producen en esta proteína afectan a la dimensión vertical (peso molecular) y, sobre todo, a la dimensión horizontal (punto isoelectrico), especialmente en los *spots* situados en torno a 100 kDa, donde las diferencias son mucho más aparentes en cuanto al número de *spots* que aparecen y a la amplitud en el punto isoelectrico y distribución de los *spots* en este rango. El rango del punto isoelectrico de la NopA100 se extiende de 4,1 a 6,6 en poblaciones meristemáticas, mientras que para poblaciones no meristemáticas el rango se estrecha de 4,8 a 6,1. Además se observa una drástica disminución en el número de *spots* que componen el conjunto de proteínas reveladas por el anticuerpo anti-NopA100, pasando de 42 en meristemáticas a 29 en no meristemáticas. Esta distribución es el reflejo de la existencia de las diferentes

isoformas en las que se presenta la proteína, que son mucho más numerosas en células meristemáticas. Además, esta heterogeneidad de isoformas de la proteína es reducida tras el tratamiento con la fosfatasa alcalina, por lo que podemos sugerir que muchas de estas isoformas representan diferentes estados de fosforilación de la proteína. Esta conclusión es consistente con estudios previos realizados con la nucleolina y las proteínas semejantes a nucleolina. En muchos grupos taxonómicos en los que esta proteína (o sus homólogos) han sido identificados, se ha demostrado que se trata de una fosfoproteína (De Cárcer *et al.*, 1997; Tuteja y Tuteja 1998). De acuerdo con estas observaciones, nosotros hemos observado que la NopA100 es la proteína más altamente fosforilada en el extracto S2 de núcleos de células proliferantes de cebolla (De Cárcer *et al.*, 1997). Puesto que la NopA100 tiene un alto grado de fosforilación en células proliferantes, el cual se ve fuertemente disminuido en células no proliferantes, sugerimos que la actividad de la proteína es modulada por la fosforilación.

Realmente, la fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales que más se dan en las proteínas, y supone un mecanismo de regulación de su actividad que puede depender del grado de fosforilación que presenta la proteína y de los lugares, dentro de la secuencia de aminoácidos, donde se produzca la fosforilación. Para la nucleolina de mamíferos se ha mostrado la existencia de lugares potencialmente fosforilables por la cdc2 quinasa y por la caseína quinasa II (CKII) (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987, Belenguer *et al.*, 1990). En los ensayos de desfosforilación realizados con la fosfatasa alcalina se observa claramente cómo los fosfatos contribuyen de manera apreciable al peso molecular de la proteína en los extractos solubles de las poblaciones meristemáticas. Respecto de la NopA64, en trabajos previos de fosforilación *in vitro* se pudo confirmar que la NopA64 es otra proteína fosforilada, al menos en una de las bandas que forman el doblete reconocido por el anticuerpo específico en las poblaciones meristemáticas (De Cárcer *et al.*, 1997) al igual que se demostró su colocalización con quinasas (Medina *et al.*, 2001).

Todos estos datos sugieren que la gran heterogeneidad del punto isoeléctrico de la NopA100 en poblaciones meristemáticas puede ser debida a los diferentes estados de fosforilación que puede presentar, hecho comprobado tras el tratamiento de desfosforilación, al producirse una reducción drástica de estos *spots* y un desplazamiento de los mismos hacia la región más básica. Es interesante constatar que para la forma insoluble de las proteínas no se observan cambios en cuanto al punto

isoeléctrico de los *spots*, sugiriendo que la forma soluble de la proteína es la que se encuentra fosforilada, mientras que la forma insoluble se presenta desfosforilada.

Las formas solubles e insolubles de la NopA100. Significado funcional

En la fracción insoluble de los núcleos de poblaciones meristemáticas el patrón que presenta la NopA100 mediante *Western blotting* es una única banda a 100 kDa y dos bandas más a 64 y 61 kDa de peso molecular aparente, pero desaparecen todas las demás bandas intermedias que sí están presentes en la fracción soluble. A lo largo de la interfase tampoco aparecen trazas de nuevas bandas y en G2 las dos bandas de menor peso molecular presentan un máximo de expresión. Esto podría ser debido a que en S tardío existe ya un alto nivel de NopA100 de nueva síntesis, pero todavía no está activa y se acumula en la forma insoluble. El paso a G2 supone la activación de la proteína y, por tanto, la movilización de la forma insoluble pasando a la soluble. La posibilidad de esta interconversión entre la fracción soluble e insoluble de la nucleolina ya ha sido planteada por Piñol-Roma (1999). Esto significaría que la forma de la proteína que se presenta como insoluble correspondería con la forma de almacenamiento, inactiva desde el punto de vista funcional, y la forma soluble como la activa. Esta hipótesis es apoyada por los resultados obtenidos de los estudios de fosforilación y proteólisis, dos mecanismos que ocurren en la fracción soluble, mientras que la insoluble parece no verse afectada por estos procesos de modificación postraducciona que regulan la actividad de la proteína. En realidad, se han identificado dos fracciones de la NopA100 correspondientes a la matriz nuclear: la fracción soluble en alta sal y la fracción insoluble. Respecto a la relación de la nucleolina con la matriz nuclear, se ha propuesto su unión a las llamadas "secuencias MAR" (*matrix-attachment regions*) del DNA (Dickinson y Kohwshigematsu, 1995), y otros autores sugieren que la proteína está anclada a la matriz nuclear mediante su unión a estructuras que contienen RNA, probablemente partículas de RNPs (Gotzmann *et al.*, 1997).

Estudios de inmunoprecipitación en humanos para el aislamiento del complejo RNP pusieron de manifiesto que la nucleolina se encontraba asociada con las proteínas no ribosómicas B23 y fibrilarina, y ciertas proteínas ribosómicas (Piñol-Roma, 1999) junto con un grupo de proteínas sin identificar. Por su parte, Yanagida *et al.* (2001) llegaron a resultados similares, con identificación de 60 proteínas más, 40 de ellas ribosómicas. Piñol-Roma (1999) también observó una serie de fragmentos proteolíticos de la nucleolina, posiblemente como resultado de la maduración de ésta, como había

sido previamente observado (Bugler *et al.*, 1982). Las proteínas obtenidas formaron un subgrupo de entre las proteínas nucleolares totales, pero, curiosamente, se observó la falta de algunas proteínas abundantes en el nucleolo, como la Nopp140, indicando que ésta no participaba en los complejos proteicos en los que está involucrada la nucleolina.

Estos dos mismos grupos probaron que, para que se diesen las interacciones entre estas proteínas, se requería la integridad del RNA, sugiriendo que se encontraban formando un complejo ribonucleoproteico (Piñol-Roma, 1999).

Por otra parte, el *Western blotting* con el anticuerpo contra la NopA100 en poblaciones meristemáticas también detecta una banda a 120 kDa, que en geles bidimensionales se manifiesta con dos *spots* con un punto isoelectrico de 5,1. Esta misma proteína es detectada mediante la tinción específica AgNOR, tanto en geles monodimensionales SDS-PAGE, como en geles bidimensionales, con el mismo peso molecular y punto isoelectrico. Por el contrario en extractos de células diferenciadas no se detecta esta proteína. Todo indica que podría tratarse de un precursor de la NopA100, cuya existencia ha sido mencionada con anterioridad en otras nucleolinas (Bugler *et al.*, 1982).

Análisis de la ultraestructura del nucleolo a lo largo de la interfase y distribución de la NopA100 y NopA64

La estructura del nucleolo y sus variaciones respecto de la actividad celular vienen siendo objeto de observación e investigación desde hace mucho tiempo. Podemos remontarnos a Cajal (1903) para encontrar una descripción de los componentes del nucleolo de las células nerviosas tras su observación con tinción argéntica.

Al microscopio electrónico, el nucleolo de la mayoría de los tipos celulares aparece compuesto de tres tipos fundamentales de estructuras: los centros fibrilares (CFs), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG) (Risueño y Medina, 1986; Thiry y Goessens, 1996). Sin embargo, la distribución relativa de estos componentes estructurales es muy variable, dependiendo del tipo celular y del estado fisiológico de la célula, de manera que es imposible establecer un modelo estructural "tipo". No se conoce la causa funcional que dé cuenta del enorme polimorfismo del nucleolo, como soporte de una función celular muy conservada, tanto en sus mecanismos como en la identidad molecular de sus constituyentes, pero sí existen datos para un mismo tipo celular que correlacionan las variaciones funcionales con

alteraciones en la estructura (Risueño y Medina, 1986; Hadjiolov, 1985; Shaw y Jordan, 1995; Scheer y Hock, 1999; Medina *et al.*, 2000).

Con respecto a la proliferación celular y al progreso del ciclo celular son realmente pocos los estudios que han abordado las variaciones estructurales del nucleolo asociados a estos procesos, con la excepción del comportamiento nucleolar en mitosis, cuya desorganización y reorganización atrajo desde muy pronto el interés de numerosos investigadores. Respecto de la interfase, se conoce bien la estructura del nucleolo de células no proliferantes, ya sean diferenciadas o quiescentes, caracterizada por su pequeño tamaño, la ausencia de componente granular y los centros fibrilares escasos, grandes, y, en el caso de las plantas, de tipo heterogéneo (Hadjiolov, 1985; Risueño y Medina, 1986). Son más escasos los trabajos que correlacionan períodos de la interfase con morfologías nucleolares concretas, siendo así que dicha correlación presenta un alto interés básico y amplio (Sacristán-Gárate *et al.*, 1974; Junera *et al.*, 1995).

A partir de nuestros resultados en *A. cepa*, utilizando células sincronizadas con hidroximetilurea, nosotros proponemos tres modelos diferentes para células proliferantes, en función de la fase del ciclo celular (figura 55). Los nucleolos en fase G1, pertenecientes a células idénticas a células G0 en cuanto a la carga de DNA, pero fisiológicamente diferentes, muestran grandes diferencias con estos en cuanto al tamaño, composición y distribución de sus componentes. La presencia de una vacuola central en células en estado G1 podría ser la expresión morfológica de la delimitación de un territorio nucleolar dentro del núcleo que todavía no está ocupado en su totalidad por RNPs, puesto que la actividad biosintética es todavía escasa, pero que se "acota" en esta fase en previsión del desarrollo posterior del orgánulo a lo largo del ciclo. De hecho, esta vacuola desaparece a medida que aumenta la actividad nucleolar, siendo "rellenada" por precursores ribosómicos recién sintetizados (CFD), lo que sucede a partir de la fase G1.

El modelo nucleolar propuesto para la fase S es similar al de G1, pero carece de vacuola central, y presenta un sustancial aumento del CG con respecto al modelo de G1, aunque con localización periférica, al igual que ocurre en el caso del CG presente en G1. Modelos similares se han visto tanto en animales (Alvarez *et al.*, 2003) como en plantas, durante la germinación de las semillas del maíz (Mineur *et al.*, 1998).

Finalmente, en el período G2 se han descrito dos tipos morfológicos: uno que presenta en corte masas redondeadas de CFD con CFs pequeños y homogéneos en su interior, totalmente rodeados por abundante CG, y otro, evolucionado del anterior, en el

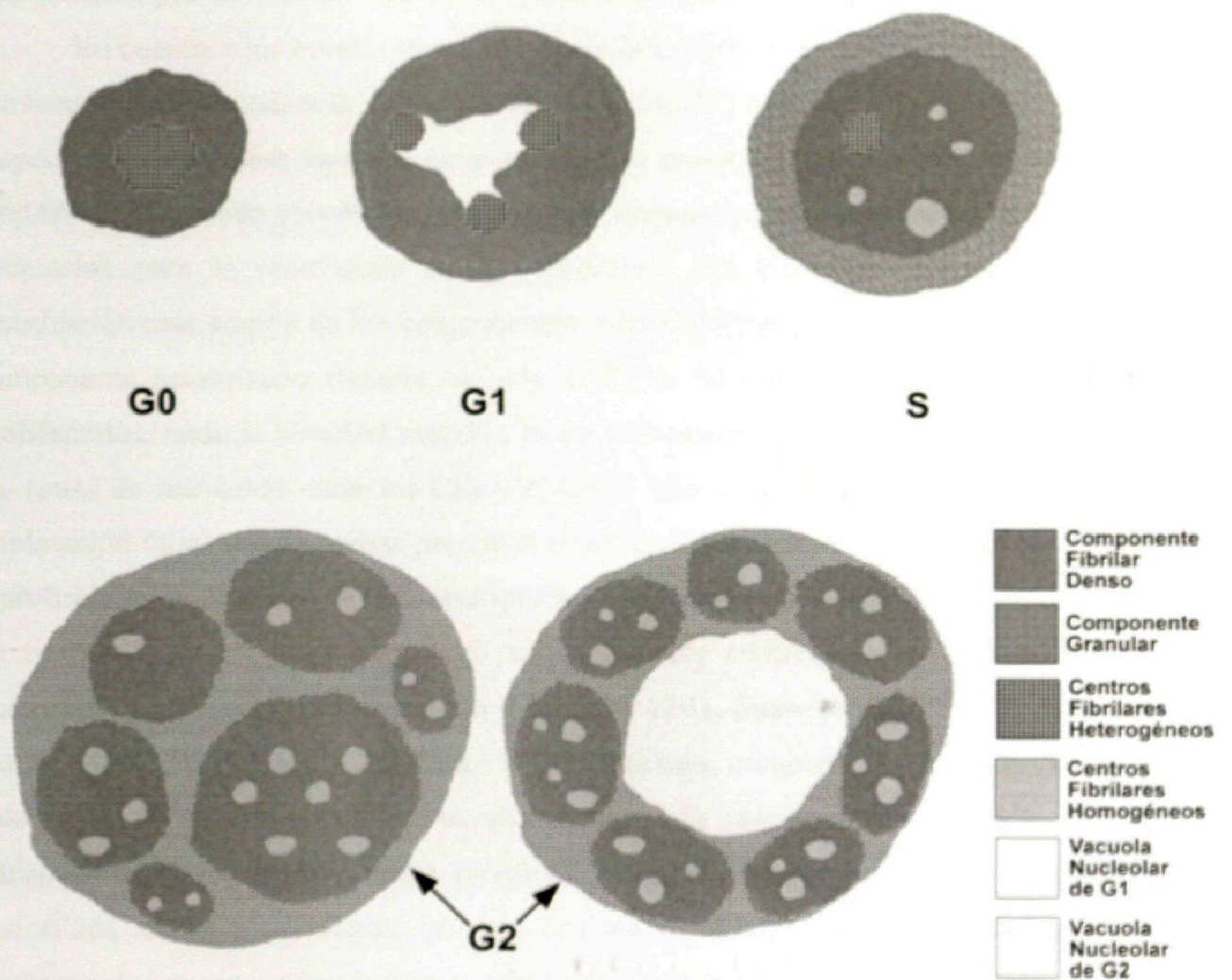


Figura 55.- Modelos de organización ultraestructural de los nucleolos a lo largo de la interfase.

que la organización de los componentes estructurales es periférica, dejando en el interior una vacuola, más o menos grande, llena de partículas prerribosómicas. Esta vacuola nucleolar de G2 es claramente diferente de la de G1, no sólo por su contenido sino también por su relación con los CFs, que existe en G1 y no existe en G2.

En cuanto a los niveles cuantitativos de NopA100 y NopA64, evaluados a nivel ultraestructural (abundancia de granos de oro estimada como densidad de marcado), la NopA100 en cualquier fase del ciclo celular, ha resultado ser siempre, superior a la NopA64. El marcado en células diferenciadas supone los niveles basales de la célula, necesarios para la renovación de los ribosomas. La NopA100 ha mostrado una distribución más amplia en los componentes subnucleolares, aunque en ambos casos el componente mayoritario siempre ha sido el CFD. En cualquier caso, en las células proliferantes, tanto la NopA64 como la NopA100 mostraron un marcado preferente en las zonas de transición entre los CFs y el CFD. Esta localización es coherente con la implicación funcional de ambas proteínas en el procesamiento temprano del pre-rRNA, y probablemente también en la transcripción de los genes ribosómicos, ya que este área de transición es el lugar propuesto como sustrato estructural de la transcripción nucleolar (Martín *et al.*, 1989; Martín y Medina, 1991; Shaw y Jordan, 1995; Scheer y Hock, 1999; De Cárcer y Medina, 1999). Además, también se ha demostrado la colocalización de la NopA64 con la cdc2 quinasa y la caseína quinasa II en la zona de transición CF-CFD y en la zona proximal del CFD, sugiriendo que la NopA64 es fosforilada en estos territorios, que son críticos en la transcripción y procesamiento temprano de los genes ribosómicos y del pre-rRNA (Medina *et al.*, 2001).

Un homólogo en guisante de la DNA helicasa I de humanos (PD65) presenta grandes similitudes funcionales y de distribución con la nucleolina (Tuteja *et al.*, 2001), cuya actividad helicasa de ácido nucleicos es bien conocida (Tuteja *et al.*, 1995). La proteína de guisante se localiza en los lugares de transcripción del rDNA, se fosforila por CKII y cdc2 quinasa y tiene actividad DNA y RNA helicasa. La masa molecular de esta helicasa es de 65kDa, la cual corresponde con la masa molecular ya descrita para la nucleolina de guisante (Tong, *et al.*, 1995 y 1997) y coincide sustancialmente con la NopA64, estudiada en el presente trabajo y ya definida previamente en nuestro laboratorio como una proteína con importantes homologías con la nucleolina (De Cárcer *et al.*, 1997).

Así pues, la relación entre la NopA100 y NopA64 está clara en cuanto a su distribución celular, dependencia del ciclo celular y proliferación celular, actuación de ambos como dianas de quinasas y sobre todo, porque están inmunológicamente relacionadas, compartiendo epítomos. La NopA64 podría ser el resultado de un proceso proteolítico de la NopA100, de modo que aquella sería un fragmento de ésta, como se ha propuesto en otros modelos biológicos (Sirri *et al.*, 2000). No obstante, la existencia de una reacción inmunológica cruzada no supondría descartar totalmente otras alternativas como bases de la relación entre las dos proteínas, tales como la duplicación de un gen ancestral, o la existencia de procesos de *splicing* alternativo.

Análisis de la estructura primaria de las nucleolinas

La relación inmunológica entre la NopA100 y NopA64 ha quedado claramente probada pero además, en trabajos previos de nuestro grupo (De Cárcer *et al.*, 1997) también se ha probado la reacción cruzada del anticuerpo anti-NopA64 con otras proteínas de plantas (alfalfa), mamíferos (hámster, ratón, HeLa) y levaduras (*S. pombe*), demostrando que ésta proteína contiene epítomos muy conservados en los diferentes grupos taxonómicos. Para el caso de la NopA100 la reacción cruzada del anticuerpo anti-NopA100 fue positiva con células vegetales de alfalfa y animales de ratón (De Cárcer, 1997).

El análisis de las secuencias parciales de aminoácidos obtenidos de la NopA100 también muestra un alto grado de identidad con diversos organismos. El análisis detallado de todas las secuencias de aminoácidos disponibles hasta el momento de los diferentes organismos nos ha permitido confirmar el alto grado de identidad existente entre todas ellas y pensar en la hipótesis de un origen común, tratándose en este caso, de proteínas homólogas.

Utilidad de los métodos proteómicos. Métodos alternativos

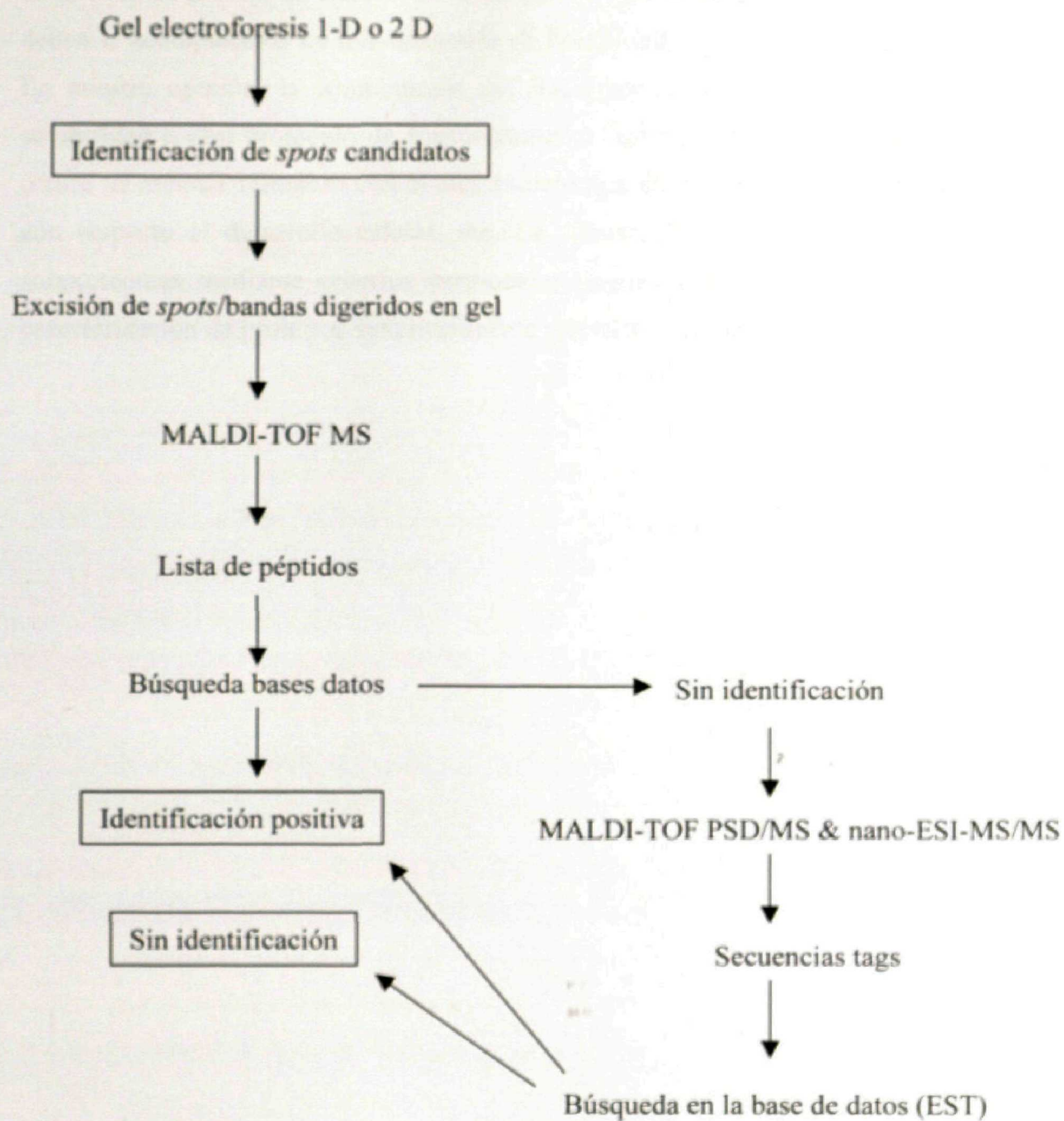
Los métodos proteómicos han sido utilizados para la identificación directa de proteínas presentes en grandes bases de datos genómicas utilizando secuencias *tag* de péptidos obtenidos por espectrometría de masas en tandem. Estos métodos han sido utilizados en *Arabidopsis thaliana* (Prime *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2001; Chivasa *et al.*, 2002), tanto como en humanos (Yanagida *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002). Sin embargo, su uso ha sido fuertemente facilitado por la existencia de

genomas secuenciados para los modelos biológicos que fueron objeto de estos estudios (Shevchenko *et al.*, 1996).

Desde que O'Farrel introdujo el 2-D PAGE (O'Farrel, 1975), este método ha sido reconocido como el más eficiente y rápido procedimiento para separar proteínas. Para la comparativa funcional de estudios proteómicos en plantas, tales como el aportado aquí, en patrón bidimensional ha producido una información muy útil para observar cambios en las proteínas. Esta información supone un buen punto de partida para la identificación de estos *spots* que son proteínas candidatas a tener un significado funcional. Este objetivo puede ser afrontado desde diferentes métodos disponibles, tales como la microsecuenciación interna de péptidos (Costa *et al.*, 1999), secuenciación por Edman y espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, o MS/MS) (Shen *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2000).

Con las técnicas clásicas de proteómica, para la obtención de información de proteínas nucleolares relativas a la proliferación celular en especies sin disponer de la información genómica, la utilización de un análisis de *spots* de manera aleatoria supondría un enorme trabajo si cada *spot* del proteoma nuclear o nucleolar tuviera que ser analizado y comparado con la información disponible de las posibles proteínas homólogas de especies más o menos relacionadas tal como proponen Liska y Shevchenko (2003). Aunque reconocemos que la compilación final del proteoma de organismos requerirá la correlación del análisis de las secuencias parciales de las proteínas expresadas con los datos genómicos, nuestra estrategia ofrece una técnica rápida para la identificación inicial de proteínas cuya regulación puede correlacionar con la proliferación celular. La selección de *spots* candidatos que corresponden a la proteína relevante para nuestros objetivos se ha facilitado en gran medida por la siguiente estrategia: a) el uso de una fracción de proteínas nucleares conocido por estar enriquecido en ribonucleoproteínas; b) el uso de un método de tinción selectiva, como el AgNOR, del que se sabe que detecta proteínas nucleolares relativas a la proliferación celular. Cuando combinamos nuestra tinción AgNOR de la fracción S2 con el *Western blotting* de la misma fracción utilizando un anticuerpo específico contra la NopA100, podemos confirmar que la tinción AgNOR de los geles 2-D ha identificado este homólogo de la nucleolina de mamíferos.

Esta identificación de *spots* candidatos debe de ser seguida por la utilización de otras técnicas, como el *Western blot* o análisis de espectrometría de masas de los *spots* previamente seleccionados, para demostrar la identidad de la proteínas en cuestión u



Esquema 1.- Protocolo para el análisis proteómico, con la introducción de un paso previo, la identificación de spots candidatos funcionalmente significativos. (Adaptado de van Wijk, 2001).

obtener datos previos de su secuencia, necesarios para su caracterización. Tales estudios deben ir acompañados de una búsqueda de homologías en bases de datos disponibles. En nuestra opinión, la combinación del fraccionamiento de proteínas basado en la solubilidad u otro protocolo de fraccionamiento, electroforesis 2-D y tinción de plata, ofrece un método ventajoso con el cual caracterizar un tipo celular u obtener evidencias con respecto al desarrollo celular, etc. La caracterización del tipo celular utilizando subproteomas mediante criterios funcionales, facilitará la búsqueda, identificación y caracterización de proteínas funcionalmente relevantes (esquema 1).

2. La tinción de tinción con plata de los subproteomas

identificar sus polímeros de proteínas nucleares
relacionados a la proliferación celular. Entre los
por esta técnica, como a la NopA100 y la NopA101
que se encuentran al nivel de los 43 y 44 kDa
homología de la B23 de mamíferos. Este
existencia de una proteína en el núcleo de

3. NopA100 y NopA101 son dos proteínas nucleares

de células eucariotas. Ambas se encuentran en el núcleo
proteína nucleolar. El NopA100 y el NopA101
dependientes del estado proliferativo de la célula
encuentro en la célula. Ambas proteínas nucleares
diferenciadas y su actividad en el núcleo
en relación con el ciclo de la célula. El NopA100
funcionales sugieren que la actividad de estas proteínas
con el mismo patrón.

4. La actividad de la NopA100 está regulada

posttranslacionalmente por la fosforilación de la
que tiene lugar en la fase G1 del ciclo celular
el progreso de la célula. El NopA100 y el NopA101
de la NopA100 y la NopA101.

CONCLUSIONES

1. Las células proliferantes de la raíz de *Allium cepa* expresan una cantidad ostensiblemente mayor de proteínas nucleares que las células diferenciadas, como se pone de manifiesto tras la separación electroforética bidimensional. Incluso entre las proteínas que aparecen en ambos tipos celulares existen diferencias en sus niveles cuantitativos. La mayoría de las proteínas específicamente expresadas en células proliferantes se encuentran en la fracción soluble de los núcleos, frente a la fracción insoluble.
2. La técnica de tinción con plata del organizador nucleolar (AgNOR) permite identificar una colección de proteínas nucleolares solubles ácidas especialmente asociadas a la proliferación celular. Entre las proteínas mayoritarias reveladas por esta técnica, junto a la NopA100 y la NopA64, se encuentran dos grupos de *spots* situados al nivel de los 43 y 42 kDa, correspondientes a la proteína homóloga de la B23 de mamíferos. Este resultado muestra por primera vez la existencia de esta proteína en el nucleolo de células vegetales.
3. NopA100 y NopA64 son dos proteínas nucleolares extraídas de células de la raíz de *Allium cepa*. Ambas se tiñen por el método AgNOR, siendo la NopA100 la proteína mayoritariamente teñida. El nivel y la actividad de estas proteínas son dependientes del estado proliferativo y de la fase del ciclo celular en el que se encuentre la célula. Ambas proteínas muestran un nivel basal en células diferenciadas, y su síntesis es estimulada en células proliferantes hasta presentar un máximo en el período G2 de la interfase del ciclo celular. Los indicadores funcionales muestran que la actividad de ambas proteínas evoluciona de acuerdo con el mismo patrón.
4. La actividad de la NopA100 está regulada mediante modificaciones postraduccionales, entre las que se encuentran la fosforilación y la proteólisis, que tienen lugar en la fracción soluble de los núcleos. Existe una relación entre el progreso del ciclo celular, el aumento de la actividad del nucleolo, la actividad de la NopA100 y la degradación proteolítica de ésta. Así pues, la proteólisis de

la NopA100 es el efecto de la maduración de la proteína, subsiguiente a su actividad.

5. La forma soluble de la NopA100 presenta un alto grado de fosforilación y numerosas isoformas de distinto punto isoelectrico correspondientes a distintos grados de fosforilación. Tanto el grado de fosforilación como el número de isoformas se reducen fuertemente en la forma insoluble y en células no proliferantes, por lo que la fosforilación aparece estrechamente unida a la actividad funcional de la NopA100.
6. La NopA100 presenta una alta identidad con la nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina de otras especies. A partir del análisis de secuencias en la NopA100 y proteínas homólogas se ha encontrado una alta conservación evolutiva de la proteína entre diferentes especies.
7. Los nucleolos de células proliferantes presentan tres modelos ultraestructurales básicos dependientes de la fase del ciclo celular en el que se encuentre la célula, esto es, G1, S y G2. Las variaciones entre ellos afectan al tamaño, a la proporción y distribución del componente granular, a la organización del componente fibrilar denso, al número, tamaño y tipo de centros fibrilares y a la presencia de una vacuola central, distinta en G1 y en G2. La definición de estos modelos permite definir la fase del ciclo y, consiguientemente, la actividad nucleolar, a partir de parámetros estructurales.
8. Las proteínas NopA100 y NopA64, por su dependencia de la proliferación y ciclo celular y por su papel funcional en la biogénesis de los ribosomas, ponen en relación ambos procesos en la célula y son, por tanto, proteínas marcadoras de alteraciones de estos procesos. Así pues, hemos propuesto su utilización como indicadores de alteraciones en el ciclo celular y en la biogénesis de los ribosomas debidas a la microgravedad sobre células crecidas en ambiente espacial.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M., Vera M.I. (2002)
An increased expression of nucleolin is associated with nucleolar segregation during acclimatization of the carp. Suministrado a la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ.
- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M., Vera, M.I. (2003)
An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 152-158.
- Allain, F.H., Bouvet, P., Dieckmann, T., Feigon, J. (2000)
Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *RMBO J.* **19**, 6870-6881.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H.B., Mann, M., Lamond, A.I. (2002)
Directed proteomic análisis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* **12**, 1-11.
- Aris, J.P., Blobel, G. (1991)
cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 931-5.
- Barneche, F., Steinmetz, F., Echeverria, M. (2000)
Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **275**, 27212-27220.
- Baserga, R. (1984)
Growth in size and cell DNA replication. *Exp. Cell Res.* **151**, 1-5.
- Baserga, S.J., Yang, X.W., Steitz, J.A. (1991)
An intact Box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *EMBO J.* **10**, 2645-2651.
- Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Labbé, J.C., Dorée, M., Amalric, F. (1990)
Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34^{cdc2} protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **10**, 3607-3618.
- Beven, A.F., Lee, R., Razaz, M., Leader, D.J., Brown, J.W.S., Shaw, P.J. (1996)
The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J. Cell Sci.* **109**, 1241-1251.
- Birnstiel, M.L., Wallace, H., Sirlin, J.L., Fischberg, M. (1966)
Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizing region of *Xenopus laevis*. *National Cancer Institute Monograph* **23**, 431-448.
- Bögge, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E., Hirt, H. (1996)
Developmental and cell cycle regulation of alfalfa *nucMs1*, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell* **8**, 417-428.
- Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B., Amalric, F. (1984)
Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3025-35.
- Bourbon, H.M., Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Amalric, F. (1983)
Role of phosphorylation on the maturation pathways of 100 kDa nucleolar protein. *FEBS Lett.* **155**, 218-222.
- Bourbon, H.M., Lapeyre, B., Amalric, F. (1988)

Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. *J Mol Biol.* **200**, 627-38.

Bourbon HM, Amalric F. (1990)

Nucleolin gene organization in rodents: highly conserved sequences within three of the 13 introns. *Gene.* **88**, 187-96.

Bourgeois, C.A., Hernandez-Verdun, D., Hubert, J., Bouteille, M. (1979)

Silver staining of NORs in electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **123**, 449-452.

Bouteille, M., Laval, M., Dupuy-Coin, M. (1974)

Localization of nucleolar functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. *The Cell Nucleus* **1**, 3-71.

Bouvet, P., Diaz, J.J., Kindbeiter, K., Madjar, J.J., Amalric, F. (1998)

Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 19025-9.

Bouvet, P., Allain, F.H., Finger, L.D., Dieckmann, T., Feigon, F. (2001)

Recognition of pre-formed and flexible elements of an RNA stem-loop by nucleolin. *J. Mol. Biol.* **309**, 763-775.

Bradford, MM. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **7**, 248-54.

Brown, J.W.S., Shaw, P.J. (1998)

Small nucleolar RNAs and pre-rRNA processing in plants. *Plant Cell* **10**, 649-657.

Brown, J.W.S., Clark, G.P., Leader, D.J., Simpson, C.G., Lowe, T. (2001)

Multiple snoRNA gene clusters from Arabidopsis. *RNA* **7**, 1817-1832.

Brown, J.W.S., Echeverria, M., Qu, L.H., Lowe, T.M., Bachellerie, J., Hüttenhofer, A., Kastanmayer, J.P., Green, P.J., Shaw, P., Marshall, D.F. (2003) a

Plant snoRNA database. *Nucleic Acids Res.* **31**, 432-435.

Brown, J.W.S., Echeverria, M., Qu, L.H. (2003) b

Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression. *Trends Plant Sci.* **8**, 42-49.

Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H.M., Amalric, F. (1982)

Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100kDa nucleolar protein. *Eur. J. Biochem.* **128**, 475-480.

Burssens, S., van Montagu, M., Inzé, D. (1998)

The cell cycle in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 9-19.

Busch, H., Ballal, N.R., Rao, M.R.S., Choi, Y. C. Rothblum, L.I. (1978)

Factors affecting nucleolar rDNA readouts. En: *The Cell Nucleus*, vol 5., Chromatin, parte B. H. Busch, ed. (New York, San Francisco, London: Academic Press), pp. 416-468.

Butt, Y. K., Lum, J. H. (2003)

Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. *Planta* **216**, 762-771.

Caizergues-Ferrer, M., Dousseau, F., Gas, N., Bouche, G., Stevens, B.J., Amalric, F (1984)

Induction of new proteins in the nuclear matrix of CHO cells by a heat shock: detection of a specific set in the nucleolar matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 444-450.

Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M.O., Olson, M.O.J. (1987)

Phosphorylation of nucleolin by a nuclear type NII protein kinase. *Biochemistry* **26**, 7876-7883.

Calzergues-Ferrer, M., Mariottini, P., Curie, C., Lapeyre, B., Gas, N., Amalric, F., Amaldi, F. (1989)

Nucleolin from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and expression during development. *Genes Dev.* **3**, 324-33.

Cajal, S.R. (1903)

Un sencillo método de coloración del retículo protoplasmático y sus efectos en los diversos órganos nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* **2**, 129-122.

Cerdido, A., Medina, F.J. (1995)

Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, **103**, 625-634.

Chang, W. W., Huang, L., Shen, M., Webster, C., Burlingame, A.L., Roberts, J. K. (2000)

Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol.* **122**, 295-318.

Chen, C.M., Chiang, S.Y., Yeh, N.H. (1991)

Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of self-cleaving activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 7754-7758.

Chivasa, S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., Robertson, D., Yu, X.L., Knox, J.P., Bolwell, P., Slabas, A.R. (2002)

Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis*. **23**, 1754-65.

Chen, H., Pai, C., Huang, J., Yeh, N. (1999)

Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8536-8546.

Chooi, W.Y., Leiby, K.R. (1981)

An electron microscopic method for ribosomal proteins during transcription of ribosomal DNA: a method for studying protein assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4823-4827.

Claasen, D.E., Spooner, B.S. (1994)

Impact of altered gravity on aspects of Cell Biology. *Int. Rev. Cytol.* **156**, 301-373.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., Deleage, G. (2000)

NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147-50.

Cogoli, A., Cogoli-Greuter, M. (1997)

Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* **6**, 33-79.

Costa, P., Pionneau, C., Bauw, G., Dubos, C., Bahrmann, N., Kremer, A., Frigerio, J., Plomion, C. (1999)

Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. *Electrophoresis* **20**, 1098-1108.

Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Melamed, M.R. (1980)

New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry*. **1**, 98-108.

De Cárcer, G., Lallena, M.J., Correas, I. (1995)

Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells. *Biochem. J.* **312**, 871-877.

De Cárcer, G., Cerdido, A., Medina, F.J. (1997)

NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta* **201**, 487-495.

De Cárcer, G. (1997)

Proteínas nucleolares y proliferación celular en *Allium cepa* L. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica.

De Cárcer, G., Medina, F.J. (1999)

Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J. Struct. Biol.*, **128**, 139-151.

Derenzini, M., Ploton, D. (1991)

Interphase nucleolar organizer regions in cancer cell. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **32**, 150-192.

Derenzini, M., Sirri, V., Trere, D., Ochs, R.L. (1995)

The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab. Invest.* **73**, 497-502.

Dickinson, L.A., Kohwi-Shigematsu, T. (1995)

Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 456-465.

Didier, D.K., Klee, H.J. (1992)

Identification of an *Arabidopsis* DNA-binding protein with homology to nucleolin. *Plant Mol. Biol.* **18**, 977-979.

Doerner, P., Jorgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J., Lamb, C. (1996)

Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520523.

Dolezel, J., Cihalikova, J., Weiserova, J., Lucretti, S. (1999)

Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Methods Cell Sci.* **21**, 95-107.

Doonan, J. (1996)

Plant growth: Roots in the cell cycle. *Curr. Biol.* **6**, 788-789.

Dumbar, T.S., Gentry, G.A., Olson, M.O. (1989)

Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry.* **28**, 9495-9501.

Dundr, M., Misteli, T., Olson, M.O.J. (2000)

The dynamics of postmitotic re-assembly of the nucleolus. *J. Cell Biol.* **150**, 443-446.

Dunham, V.L., Bryant, J.A. (1983)

Nuclei. In isolation of membranes and organelles and organelles from plant cells. J.L. Hall and L. Moore, eds. (London: Academic Press), pp. 237-275.

Elledge, S.J. (1996)

Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science.* **274**, 1664-72.

Eichler, D.C., Craig, N. (1994)

Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **49**, 197-239.

Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantalón, A., Amalric, F. (1988)

A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* **175**, 525-530.

Evans, L.S., Van't Hof, J. (1975)

The age-distribution of cell cycle populations in plant root meristems. *Complex tissues. Exp Cell Res.* **90**, 401-10.

Fang, F., Newport, J.W. (1991)

Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* **66**, 731-742.

Fang, S.H., Yeh, N.H. (1993)

The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. *Exp. Cell Res.* **208**, 48-53.

Fatica, A., Galardi, S., Altieri, F., Bozzoni, I. (2000)

Fibrillarin binds directly and specifically to U16 box C/D snoRNA. *RNA* **6**, 88-95.

Fey, E.G., Krochmalnic, G., Penman, S. (1986)

The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* **102**, 1654-1665.

Filipowicz, W., Pogacic, V. (2002)

Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 319-327.

Fowler, M.R., Eyre, S., Scott, N.W., Slater, A., Elliott, M.C. (1998)

The plant cell cycle in context. *Mol. Biotechnol.* **10**, 123-153.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2001)

Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiol.* **126**, 835-848.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2002)

Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol.* **129**, 823-837.

Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Puvion-Dutilleul, F., Amalric, F., Bouvet, P. (1996)

Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: Characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **260**, 34-53.

Gilbert, N., Lucas, L., Klein, C., Menager, M., Bonnet, N., Ploton, D. (1995)

Three-dimensional co-location of RNA polymerase I and DNA during interphase and mitosis by confocal microscopy. *J. Cell Sci.* **108**, 115-125.

Ginisty, H., Amalric, F., Bouvet, P. (1998)

Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* **17**, 1476-1486.

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., Bouvet, P. (1999)

Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* **112**, 761-772.

Goodpasture, C., Bloom, S.E. (1975)

Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. **53**, 37-50.

Gotzmann, J., Eger, A., Meiner, M., Grimm, R., Gerner, C., Sauermann, G., Foisner, R. (1997)

Two-dimensional electrophoresis reveals a nuclear matrix-associated nucleolin complex of basic isoelectric point. *Electrophoresis* **18**, 2645-2653.

Greimers, R., Deltour, R. (1981)

Organization of transcribed and nontranscribed chromatin in isolated nuclei of Zea mays root cells. *Eur. J. Cell Biol.* **23**, 303-311.

Gulli, M.P., Girard, J., Zabetakis, D., Lapeyre, B., Melese, T., Caizergues-Ferrer, M. (1995)

Gar2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S ribosomal subunit accumulation. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1912-1918.

Gutiérrez, C. (1998)

The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 492-497.

Gutiérrez, C., Ramirez-Parra, E., Mastellano M.M., del Pozo, J.C. (2002)

G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 480-486.

Hadjiolov, A.A. (1985)

The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell biology monographs*, **12**, New York: Springer-Verlag, 1-263.

Hannan, R.D., Rothblum, L.I. (1995)

Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **30**, 501-510.

He, D., Nickerson, J.A., Penman, S. (1990)

Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* **110**, 569-580.

Hemerly, A.S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D. (1993)

Cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-1723.

Hemleben, V., Zentgraf, U. (1994)

Structural organization and regulation of transcription by RNA polymerase I of plant nuclear ribosomal RNA genes. *Results Probl. Cell Differ.* **20**, 3-24.

Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J.M., Lees, E., Reed, S.I. (1994)

A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5291-5295.

Heukeshoven J, Dernick R. (1988)

Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*. **9**, 28-32.

Hirsch, A.M., Fang, Y. (1994)

Plant hormones and modulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.* **26**, 5-9.

Hiscox, J.A. (2002)

The nucleolus – a gateway to viral infection? *Arch. Virol.* **147**, 1077-1089.

Howard, A., Pelc, S.R. (1953)

Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6** (suppl.), 261-273.

Hozák, P., Roussel, P., Hernandez-Verdum, D. (1992)

Procedures for specific detection of silver-stained nucleolar proteins on Western blots. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1089-1096.

Huang, X., Miller, M. (1991)

A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**, 337-357.

Huntley, R.P., Murray, J.A. (1999)

The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 440-446.

Inzé, D., Gutiérrez, C., Chua, N. (1999)

Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell* **11**, 991-994.

Isaac, C., Yang, Y., Meier, U.T. (1998)

Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J. Cell Biol.* **142**, 319-329.

Jantzen, H.M., Admon, A., Bell, S.P., Tjian, R. (1990)

Nucleolar transcription factor UBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* **344**, 830-836.

Jiang, P.S., Yung, B.Y.M. (1999)

Down-regulation of nucleophosmin/B23 mRNA delays the entry of cells into mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 865-870.

Junera, H.R., Masson, C., Geraud, G., Hernandez-Verdun, D. (1995)

The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J. Cell Sci.* **108**, 3427-41.

Kaneko, T., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Asamizu, E., Tabata, S. (2000)

Suministrado a la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ.

Kersten, B., Bürkle, L., Kuhn, E.J., Giavalisco, P., Konthur, Z., Lueking, A., Walter, G., Eickhoff, H., Schneider, U. (2002)

Large-scale plant proteomics. *Plant Mol. Biol.* **48**, 133-141.

Kiss, T., Marshallsay, C., Filipowicz, W. (1991)

Alteration of the RNA polymerase specificity of U3 snRNA genes during evolution and in vivo. *Cell* **65**, 517-526.

Kiss, J.Z. (2000).

Mechanisms of the early phases of plant gravitropism. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 551-573.

Kito, S., Shimizu, K., Okamura, H., Yoshida, K., Morimoto, H., Fujita, M., Morimoto, Y., Ohba, T., Haneji, T. (2003)

Cleavage of nucleolin argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 950-956.

Komatsu, S., Kajiwar, H., Hirani, H. (1993)

TAG. Theoretical and applied genetics. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 935-942.

Kordyum, E.L. (1997).

Biology of plant cells in microgravity and under clinostating. *Int. Rev. Cytol.* **171**, 1-78.

Kotani, K., Ito, M., Hamaguchi, T., Ichikawa, K., Nakano, T., Shima, H., Nagao, M., Ohta, N., Furuichi, Y., Takahashi, T., Umekawa, H. (1998)

The delta isoform of protein phosphatase type I is localized in nucleolus and dephosphorylates nucleolar phosphoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 292-296.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-5.

Lapeyre, B., Bourbon, H., Amalric, F. (1987)

Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 1472-6.

Leader, D.J., Clark, G.P., Watters, J., Beven, A.F., Shaw, P.J., Brown, J.W.S. (1997)

Clusters of multiple different small nucleolar RNA genes in plants are expressed as and processed from polycistronic pre-snoRNAs. *EMBO J.* **16**, 5742-5751.

Leader, D.J., Clark, G.P., Boag, J., Watters, J.A., Simpson, C.G., Watkins, N.J., Maxwell, E.S., Brown, J.W. (1998)

Processing of vertebrate box C/D small nucleolar RNAs in plants. *Eur. J. Biochem* **253**, 154-160.

Lee, W.C., Xue, Z., Mélése, T. (1991)

The NSR1 gene encodes a protein that specifically binds nuclear localization sequences and has two RNA recognition motifs. *J. Cell Biol.* **113**, 1-12.

Leek, R.D., Alison, M.R., Sarraf, C.E. (1991)

Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNOR) in non-proliferating and proliferating tissues. *J. Pathol.* **165**, 43-51.

Léger-Silvestre, I., Gulli, M.P., Noaillac-Depeyre, J., Faubladiet, M., Sicard, H., Caizergues-Ferrer, M., Gas, N. (1997)

Ultrastructural changes in the *Schizosaccharomyces pombe* nucleolus following the disruption of the *gar2+* gene, which encodes a nucleolar protein structurally related to nucleolin. *Chromosoma*. **105**, 542-52.

Legué, V., Yu, F., Driss-Ecole, D., Perbal, G. (1996)

Effects of gravitropic stress on the development of the primary root of lentil seedlings grown in space. *J. Biotechnol.* **47**, 129-135.

Lewis, M.L., Reynolds, J.L., Cubano, L.A., Hatton, J.P., Lawless, B.D., Piepmeier, E.H. (1998)

Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **12**, 1007-1018.

Li, Y.P., Busch, R.K., Valdez, B.C., Busch, H. (1996)

C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **237**, 153-158.

Lischwe, M.A., Smetana, K., Olson, M.O.J., Busch, H. (1979)

Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci.* **25**, 701-708.

Liska, A.J., Shevchenko, A. (2003)

Expanding the organismal scope of proteomics: Cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* **3**, 19-28.

Litchfield, D.W. (2003)

Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* **369**, 1-15.

Lowry, O.H., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Maeshima, M., Matsuda, N. (2002)

Tobacco nucleolin. Suministrado en la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ.

Marco, R., Benguría, A., Sánchez, J., De Juan, E. (1996)

Effects of the space environment on *Drosophila melanogaster* development. Implications of the IML-2 experiment. *J. Biotechnol.* **47**, 179-189.

Maridor, G., Nigg, E.A. (1990)

cDNA sequences of chicken nucleolin/C23 and no38/B23, two major nucleolar proteins. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1286.

Markus, S.S., Ulrike, G., Christine D. (1998)

Subcellular distribution of distinct nucleolin subfractions recognized by two monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* **239**, 226-234.

Martín, M., Moreno Díaz de la Espina, S., Medina, F.J. (1989)

Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma* **98**, 368-377.

Martín, M., Medina, F.J. (1991)

A *Drosophila* anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *J. Cell Sci.* **100**, 99-107.

Martín, M., García-Fernández, L.F., Moreno Díaz de la Espina, S., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Medina, F.J. (1992)

Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp. Cell Res.* **199**, 74-84.

Masson, C., Andre, C., Arnoult, J., Geraud, G., Hernandez-Verdun, D. (1990)

A 116000 Mr nucleolar antigen specific for the dense fibrillar component of the nucleolin. *J. Cell Sci.* **95**, 371-381.

Mathesius, U., Keljzes, G., Natera, S.H.A., Weinman, J.J., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. (2001)
Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **1**, 1424-1440.

Matson, S.W., Bean, D., George, K.A. (1994)
DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays* **16**, 13-21.

McGrath, K.E., Smothers, J.F., Dadd, C.A., Madireddi, M.T., Gorovsky, M.A., Allis, C.D. (1997)
An abundant nucleolar phosphoprotein is associated with ribosomal DNA in *Tetrahymena* macronuclei. *Mol Biol Cell* **8**, 97-108.

Medina, F.J., Solanilla, E.L., Sánchez-Pina, M.A., Fernández-Gómez, M.E., Risueño, M.C. (1986)
Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. *Chromosoma* **94**, 259-266.

Medina, F.J., Martín, M., Moreno Díaz de la Espina, S. (1990)
Implications for the function-structure relationship in the nucleolus after immunolocalization of DNA in onion cells. In *Nuclear Structure and Function* (Eds. Harris, J.R. and Zbarsky, I.B.), Plenum, London, 231-235.

Medina, F.J., Cerdido, A., Fernández-Gómez, M.E. (1995) a
Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* **221**, 111-125.

Medina, F.J., Cerdido, A., Marco, R. (1995) b
Microwave irradiation improvements in the silver staining of the nucleolar organizer (AgNOR) technique. *Histochemistry* **103**, 403-413.

Medina, F.J., Cerdido, A., De Cárcer, G. (2000)
The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur. J. Histochem.* **44**, 117-131.

Medina, F.J., González-Camacho, F., Cerdido, A., De Cárcer, G. (2001)
In situ localization of the onion nucleolar protein NopA64 is dependent on cell proliferation mechanisms and cell cycle phases. In: Dini, L., Catalano, M. (eds) *Proc 5th Multinational Congr Electron Microscopy*. Rinton Press, Princeton, New Jersey, pp. 197-207.

Medina, F.J., González-Camacho, F. (2003)
Nucleolar proteins and cell proliferation in plant cells. *Recent Res. Devel. Plant Biol.* **3**, 55-68.

Meier, U.T. (1996)
Comparison of the rat nucleolar protein Nopp140 to its yeast homolog SRP40: differential phosphorylation in vertebrates and yeast. *J. Biol. Chem.* **271**, 19376-19384.

Miller, O.L. (1981)
The nucleolus chromosomes and visualization of gene activity. *J. Cell Biol.* **91**, 15s-27s.

Mineur, P., Jennane, A., Thiry, M., Deltour, R., Goessens, G. (1998)
Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by a cold stress. *J. Struct. Biol.* **123**, 199-210.

Mínguez, A., Moreno Díaz de la Espina, S. (1996)
In situ localization of nucleolin in the plant nucleolar matrix. *Exp. Cell Res.* **222**, 171-178.

Mironov, V., De Veylder, L., van Montagu, M., Inzé, D. (1999)
Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- The Nexus. *Plant Cell* **11**, 509-521.

Moreno, F.J., Hernandez-Verdun, D., Bouteille, M. (1985)
Silver staining of the nucleolar organizer regions (NORs) on lowicryl and cryo-ultrathin sections. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 389-399.

Moreno Díaz de la Espina, S. (1995)

Nuclear matrix isolated from plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **162 B**, 75-139.

Morgan, D.O. (1997)

Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261-291.

Morimoto, Y., Kito, S., Ohba, T., Morimoto, H., Okamura, H., Haneji, T. (2000)

Alteration of argyrophilic nucleolar organizer region associated (AgNOR) proteins in apoptosis-induced human salivary gland cells and human oral squamous carcinoma cells. *J. Oral Pathol. Med.* **30**, 193-9.

Morimoto, H., Okamura, H., Haneji, T. (2002)

Interaction of protein phosphatase 1δ with nucleolin in human osteoblastic cells. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1187-1193.

Moseyko, N., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., Feldman, L.J. (2002)

Transcription profiling of the early gravitropic response in *Arabidopsis* using high-density oligonucleotide probe microarrays. *Plant Physiol.* **130**, 720-728.

Nakayama, K., Nakayama, K. (1998)

Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* **20**, 1020-1029.

Nanashima, A., Yamaguchi, H., Nishizawa-Takano, J.E., Hatano, K., Shibasaki, S., Sawai, T., Yasutake, T., Obatake, M., Nakagoe, T., Ayabe, H. (2002)

Application of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining for cytology of biliary tract carcinomas. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* **9**, 485-489.

Nigg, E.A. (1995)

Cyclin-dependent protein kinase: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471-480.

Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H., Busch, H. (1985)

Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol. Cell* **54**, 123-134.

Ochs, R.L., Smetana, K. (1991)

Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix. *Exp. Cell Res.* **197**, 183-190.

O'Farrel, P.H. (1975)

High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bone, K.E., Fukasaka, K. (2000)

Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**, 127-140.

Okuwaki, M., Iwamatsu, A., Tsujimoto, M., Nagata, K. (2001)

Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J. Mol. Biol.* **311**, 41-55.

Olson, M.O.J. (1991)

The role of proteins in nucleolar structure and function. In: Strauss PR, Wilson, SH (eds) *The eukaryotic nucleus. Molecular biochemistry and macromolecular assemblies*. The Telford Press, Caldwell, New Jersey, pp 519-559.

Olson, M.O.J., Hingorani, K., Szebeni, A. (2002)

Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol.* **219**, 199-266.

Orrick, L., Olson, M.O.J., Busch, H. (1973)

Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 1316-1320.

Pelayo, H.R., Lastres, P., De la Torre, C. (2001)

Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta* **212**, 444-453.

Pellar, G.J., DiMario, P.J. (2003)

Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* **111**, 461-469.

Perry, R.P., Hell, A., Errera, M. (1961)

The role of the nucleolus in ribonucleic acid and protein synthesis. I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated hela cells. *Biochimica and Biophysica Acta* **49**, 47-57.

Perry, R.P. (1962)

The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2179-2186.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., Nigg, E.A. (1990)

Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* **60**, 791-801.

Pih, K.T., Yi, Y.S., Dhin, B.J., Cho, M.J., Hwang, I., Son, D. (2000)

Molecular cloning and targeting of a fibrillarin homolog from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **123**, 51-58.

Pikaard, C.S., McStay, B., Schultz, M.C., Bell, S.P., Reeder, R.H. (1989)

The *Xenopus* ribosomal polymerase transcription factor xUBF. *Genes Develop* **3**, 1779-1788.

Pines, J. (1995)

Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.* **308**, 697-711

Pich, A., Chiusa, L., Margaria, E. (2000)

Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* **31**, 133-141.

Piñol-Roma, S. (1999)

Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol. Biol. Cell* **10**, 77-90.

Ploton, D., Bobichon, H., Adnet, J.J. (1982)

Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissues using a one-step AgNOR staining method. *Biol. Cell* **43**, 229-232.

Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F., Adnet, J.J. (1986)

Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* **18**, 5-14.

Prime, T.A., Sherrier, D.J., Mahon, P., Packman, L.C., Dupree, P. (2000)

A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **21**, 3488-3499.

Qu, L.H., Meng, Q., Zhou, H., Chen, Y.Q., Liang-Hu, Q., Qing, M., Hui, Z., Yue-Qin, C. (2001)

Identification of 10 novel snoRNA gene clusters from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1623-1630.

Rankin, M.L., Heine, M.A., Xiao, S., LeBlanc, M.D., Nelson, J.W., DiMario, P.J. (1993)

A complete nucleolin cDNA sequence from *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 169.

Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. J., Mann, M. (2002)

Large-Scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome research* **12**, 1231-1245.

Reeder, R.H. (1990)

RNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.* **6**, 390-395.

Renaudin, J.P., Donan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., Murria J.A. (1996)

Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and type cyclins based on sequence organization **32**, 1003-18.

Risueño, M.C., Medina, F.J., Moreno Díaz de la Espina, S. (1982)

Nucleolar fibrillar center in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J. Cell Sci.* **58**, 313-329.

Risueño, M.C., Medina, F.J. (1986)

The nucleolar structure in plant cells. *Cell Biol. Revs. (RBC)* **7**, 1-154.

Rodrigo, R.M., Rendón, M.C., Rorreblanca, J., García-Herdugo, G., Moreno, F.J. (1992)

Characterization and immunolocalization of RNA polymerase I transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher plant and vertebrate cells. *J. Cell Sci.* **103**, 1053-1063.

Roger, B., Moisan, A., Amalric, F., Bouvet, P. (2003)

Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma* **111**, 399-407.

Rossignol, M. (2001)

Analysis of the plant proteome. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 131-134.

Rothblum, L.I., Mamrack, P.M., Kunkle, H.M., Olson, M.O.J., Busch, H. (1977)

Fractionation of nucleoli. Enzymatic and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic analysis. *Biochemistry* **16**, 4716-4721.

Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F., Hernandez-Verdun, D. (1992)

Nucleolin is an AgNOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp. Cell Res.* **203**, 259-269.

Roussel, P., Hernandez-Verdun, D. (1994)

Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp. Cell Res.* **214**, 465-472.

Roussel, P., Sirri, V., Hernandez-Verdun, D. (1994)

Quantification of AgNOR proteins using AgNOR staining on western blots. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 1513-1517.

Roussel, P., André, C., Comai, L., Hernandez-Verdun, D. (1996)

The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J. Cell Biol.* **133**, 235-246.

Sacristán-Gárate, A., Navarrete, M.H., De la Torre, C. (1974)

Nucleolar development in the interphase of the cell cycle. *J. Cell Sci.* **16**, 333-347.

Saez-Vasquez, J., Meissner, M., Pikaard, C.S. (2001)

RNA polymerase I holoenzyme-promotor complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant Mol. Biol.* **47**, 449-459.

Scheer, U., Rose, K.M. (1984)

Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1431-1435.

Scheer, U., Benavente, R. (1990)

Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays* **12**, 14-21.

Scheer, U., Hock, R. (1999)

Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 385-390.

Scherl, A., Couté, Y., Dèon, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sánchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D., Díaz, J.J. (2002)

Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4100-4109.

Schmidt-Zachmann, M.S., Nigg, E.A. (1993)

- Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J. Cell Sci.* **105**, 799-806.
- Schnapp, A., Pflüderer, C., Rosenbauer, H., Grummt, I. (1990)**
A growth-dependent transcription initiation factor (TIF-1A) interacting with RNA polymerase I regulates mouse ribosomal RNA synthesis. *EMBO J.* **9**, 2857-2863.
- Schnapp, A., Grummt, I. (1991)**
Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factors and RNA polymerase I. *J. Biol. Chem.* **266**, 24588-24595.
- Schwab, M.S., Dreyer, C. (1997)**
Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *Eur. J. Cell Biol.* **73**, 287-297.
- Segers, G., Rouzé, P., van Montagu, M., Inzé, D. (1998)**
Cyclin dependent kinases in plants. In *Plant cell proliferation and its regulation in growth and development*. Edited by Bryant JA, Chiatante D. Chichester, Wiley; 1-19.
- Shaw, P.J., Jordan, E.G. (1995)**
The Nucleolus. *Annu. Rev. Cell Biol.* **11**, 93-121.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silve, P.A., Lee, M.S. (1998)**
Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP protein. *Genes Dev.* **12**, 679-691.
- Shen, S., Matsubae, M., Takao, T., Tanaka, N., Komatsu, S. (2002)**
A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. *J. Biochem.* **132**, 613-620.
- Shen, S., Jing, Y., Kuang, T. (2003)**
Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics* **3**, 527-535.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., Mann, M. (1996)**
Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14440-14445.
- Sipos, K., Olson, M.O. (1991)**
Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 673-678.
- Sirri, V., Roussel, P., Trenè, D., Derenzini, M., Hernandez-Verdun, D. (1995)**
Amount variability of total and individual AgNOR proteins in cells stimulated to proliferate. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 887-893.
- Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M-C., Hernandez-Verdun, D. (1997)**
Amount of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* **28**, 147-156.
- Sirri, V., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D. (2000)**
The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* **31**, 121-126.
- Spector, D.L., Ochs, R.L., Busch, H. (1984)**
Silver-staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* **90**, 139-148.
- Srivastava, M., Fleming, P.J., Pollard, H.B., Burns, A.L. (1989)**
Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett.* **250**, 99-105.
- Stals, H., Inzé, D. (2001)**

When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* **6**, 359-64.

Szebeni, A., Olson, M.O. (1999)

Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci.* **8**, 905-12.

Tanaka, K.J., Nishikata, T. (1999)

Ascidian Nucleolin like protein. Suministrado en la base de datos de EMBL/GenBank/DDBJ.

Tanaka, K. J., Kawamuea, H., Nishikata, T. (2000)

The transcript coding for an RNA-binding protein is localized in the anterior side of the ascidian 2-cell stage embryo. *Dev. Genes Evol.* **210**, 464-466.

Tao, W., Xu, W., Valdivia, M.M., Hao, S., Zhai, Z.H. (2001)

Distribution and transcription activity of nucleolar DNA in higher plant cells. *Cell Biol. Int.* **11**, 1167-1171.

Tao, W., Huang, B., Liu, C., Zhai, Z.H. (2003)

In situ visualization of rDNA arrangement and its relationship with subnucleolar structural regions in *Allium sativum* cell nucleolus. *J Cell Sci.* **116**, 1117-25.

Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., de Vienne, D., Zivy, M. (1999)

Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* **20**, 2013-2026.

Thiellement, H., Zivy, M., Plomion, C. (2002)

Combining proteomic and genetic studies in plants. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **782**, 137-149.

Thiry, M., Goessen, G. (1996)

The nucleolus during the cell cycle, in Champman and Hall (Eds.) *Molecular Biology Intelligence*, Unit 1, pp. 1-114, R.G. Landes, New York.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994)

Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., Hurt, E.C. (1993)

Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* **72**, 443-457.

Tong C.G., Hsieh H.L., Blumenthal S., Reichler S., Balk J., Roux S.J. (1995)

Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. Publicado en la base de datos de EMBL/GenBank/DDBJ.

Tong C.G., Reichler S., Blumenthal S., Balk J., Hsieh H.L., Roux S.J. (1997)

Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. *Plant Physiol.* **114**, 643-652.

Tuteja, N., Huang, N. W., Skopac, D., Tuteja, R., Hrvatic, S., Zhang, J., Pongor, S., Joseph, G., Faucher, C., Amalric, F., Falaschi, A. (1995)

Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation. *Gene* **160**, 143-148.

Tuteja, N., Tuteja, R. (1996)

DNA helicases: the long unwinding road. *Nat. Genet.* **13**, 11-12.

Tuteja, N. (1997)

Unraveling DNA helicases from plant cells. *Plant Mol Biol.* **33**, 947-952.

Tuteja, R., Tuteja, N. (1998)

Nucleolin: A multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 407-436.

Tuteja, N., Beven, A., Shaw, P.J., Tuteja, R. (2001)

A pea homologue of human DNA helicase I is localized within the dense fibrillar component of the nucleolus and stimulated by phosphorylation with CK2 and cdc2 protein kinase. *Plant J.* **25**, 9-17.

Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., Inzé, D. (2002)

Genome-Wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* **14**, 903-916.

van Wijk, K.J. (2001)

Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* **126**, 501-508.

Verde, F., Dogterom, M., Stelzer, E., Karsenti, E., Leibler, S. (1992)

Control of microtubule dynamics and length by cyclin A-dependent and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* **118**, 1097-11078.

Wang, H., Boisvert, D., Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H. (2000)

Crystal structure of a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *EMBO J.* **19**, 317-323.

Waring, M.J. (1965)

Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **13**, 269-282.

Warner, J.R. (1990)

The nucleolus and ribosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 521-527.

Weisenberger, D., Scheer, U. (1995)

A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.* **129**, 561-575.

Xing, T., Ouellet, T., Miki, B.L. (2002)

Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**, 224-230.

Yamaguchi, M., Fabian, T., Sauter, M., Bhalerao, R.P., Schrader, J., Sandberg, G., Umeda, M., Uchimiya, H. (2000)

Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J.* **24**, 11-20.

Yanagida, M., Shimamoto, A., Nishikawa, K., Furuichi, Y., Isobe, T., Takahashi, N. (2001)

Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. *Proteomic* **1**, 1390-1404.

Yang, Y., Isaac, C., Wang, C., Dragon, F., Pogacic, V., Meier, U.T. (2000)

Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Mol. Biol. Cell* **11**, 567-577.

Young, C.W., Hodas, S. (1964)

Hidroxiurea inhibitory effect on DNA metabolism. *Science.* **146**, 1172-4.

Yu, Y., Steinmetz, A., Meyer, D., Brown, S., Shen, W.H. (2003)

The Tobacco A-Type Cyclin, Nicta;CYCA3;2, at the Nexus of Cell Division and Differentiation. *Plant Cell.* **15**, 2763-77.

Fernando González-Camacho
Francisco Javier Medina

Centro de Investigaciones
Biológicas (CSIC),
Madrid, Spain

Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis

The soluble fraction of nuclear proteins is a functionally significant fraction, since it has been shown that it contains ribonucleoproteins active in nuclear RNA metabolism. The aim of this work was to detect variations associated with cell proliferation, by comparing two-dimensional proteomes obtained from the soluble fractions of onion nuclei isolated from actively proliferating root meristematic cells versus nonmeristematic root cells. In particular, we have studied the physicochemical features of the major nucleolar protein NopA100, a highly phosphorylated, nucleolin-like protein. A total of 384 spots were quantified in meristematic nuclei, while only 209 were detected in nonmeristematic nuclei. The comparison of both proteomes resulted in the determination of specific spots for each proliferative state and those which were common to both cases. Furthermore, among these latter, we could discriminate quantitative differences. Interestingly, well-known nucleolar proteins, such as RNA polymerase I, B23 and the nucleolin-like protein NopA100, were significantly increased in proliferating cells. Western blots with anti-NopA100 antibody demonstrated 26 spots in the meristematic sample. All the spots detected were clustered at 100 kDa and were distributed through an isoelectric point (pI) range of 4.3–6.6. In contrast, only seven spots were found in the extract from nonmeristematic nuclei, and the pI range was shortened to 4.8–6.1. These results indicate that the state of NopA100 phosphorylation correlates with the degree of nucleolar activity, i.e. the protein is more highly phosphorylated in cycling cells. We have also analyzed the bidimensional silver staining of the nucleolar organizing region (Ag-NOR) pattern of the soluble nuclear fraction in order to identify plant cell phosphoproteins that are considered to be markers of proliferation. These experiments demonstrated that NopA100, the onion, nucleolin-like protein, is an Ag-NOR protein. In addition we found that the plant homologue of the vertebrate nucleolar phosphoprotein B23 migrated as two clusters of acidic spots, 43 and 42 kDa respectively in molecular mass. The differences between these features and those described for mammalian cells is discussed. Our results demonstrate that the use of protein fractionation procedures with functional significance and the location of candidate spots by indirect techniques are advantageous, complementary methods to random selection procedures for proteomic studies involving further mass spectrometry analysis.

Keywords: *Allium cepa* / Cell proliferation / Nucleolar protein / Nucleolin-like protein / Silver staining of the nucleolar organizing region
PRO 0645

1 Introduction

The nucleolus is the nuclear domain in which the major portion of ribosome biogenesis takes place. This is a fundamental process for the life of the cell and begins with

the transcription of the pre-rRNA molecule, which is followed by a complex process that leads to the generation of 18S, 5.8S and 28S rRNA and their assembly into the 40S and 60S ribosomal subunits. The importance of this process resides not only in the intrinsic significance of ribosomes as key factors for protein synthesis, but also in that it is a paradigm for gene expression studies, due to the fact that rRNA synthesis can represent 60–70% of nuclear RNA synthesis. Furthermore, the process of ribosome biogenesis must respond to virtually all of the signal transduction cascades that regulate cellular growth, both mitotic and hypertrophic, and homeostasis in order to provide for the cell's requirements for protein synthesis [1–4].

Correspondence: Mr. Fernando González-Camacho, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain
E-mail: fgonzalez@cib.csic.es
Fax: +34-91-536-04-32

Abbreviations: Ag-NOR, silver staining of the nucleolar organizing region; NSB, nuclei stock buffer; PBST, phosphate-buffered saline plus Tween 20; RNP, ribonucleoproteins

The 'nucleolar proteins' play a highly significant role in the regulation of ribosome biogenesis and in its interaction with other cellular processes. The role of these proteins is restricted to intermediate steps in ribosome biogenesis, so that they are not found in the mature ribosome; in topological terms, these proteins act within the confines of the nucleolus, which is the reason for their name [5]. In actively proliferating cells, in which all the cellular functions are conditioned by the major objective of cell growth and division, nucleolar proteins are, in turn, the targets of factors involved in the control and regulation of the cell division cycle, with the purpose of coordinating the rate of ribosome production with the rate of cell proliferation. The practical and methodological consequence of this fact is that nucleolar activity is recognized to be one of the best markers of cell proliferation and cell cycle progression. More interestingly, the rate of cell proliferation can be assessed by means of the cytochemical detection of some nucleolar proteins by staining methods, such as the silver staining of the nucleolar organizer (Ag-NOR) [2, 4, 6].

Proteomic techniques have recently been used with the purpose of resolving the full catalogue of nucleolar proteins in the human nucleolus [7, 8]. Although the two published studies did not arrive at the same results, it is striking to note that of the nearly 350 proteins of the nucleolar proteomic catalogued less than 100 of them were actually identified in functional terms. Furthermore, it should be noted that a significant proportion of these proteins are involved in functions beyond the known role of the nucleolus, *i.e.* ribosome biogenesis [7, 8]. Unfortunately, equivalent proteomic analyses have not yet been performed for the plant cell nucleolus, although the completion of the genomic sequence of *Arabidopsis* and current technological advancements [9] suggest that we may see this in the near future.

Therefore, the identification and characterization of functionally significant nucleolar proteins in plant cells is still an exciting challenge. For that reason, we have approached the proteomic analysis of the plant nucleolus using mainly functional criteria. In fact, the goal that led us to the use of proteomic techniques was to find an answer to functional questions related to the connection between ribosome biogenesis and cell proliferation. For this purpose, we have analyzed nuclear subproteomes, obtained after sequential fractionation of nuclear proteins according to their solubility in buffers of increasing ionic strength. From these fractions, the most soluble one, called S2 extract, is actually a functionally significant fraction, since it has been shown that it contains ribonucleoproteins (RNPs) active in RNA metabolism, including pre-rRNA synthesis and processing [10–13].

This subproteome has been studied by comparing the bidimensional patterns obtained from undifferentiated, actively proliferating cells of root meristematic cells with those obtained from nondividing, differentiated cells of the root. Our goal was to identify proteins effectively associated with cell proliferation and quantitatively estimating their variations. Furthermore, within this plant nuclear subproteome, we have paid special attention to those nucleolar proteins whose expression levels are known to be indicators of the proliferation state of the cell. Among these proteins, the so-called 'Ag-NOR' proteins, being the molecular target of the silver staining cytochemical method, mentioned above, are especially interesting. Fortunately, there is a method capable of reproducing the cytochemical staining on Western blots, which has allowed the unequivocal identification of the Ag-NOR proteins [14]. Thus, a direct correlation between the cell proliferation rate, the intensity of the cytochemical silver staining (densitometrically assessed) and the amount of Ag-NOR proteins [15] has been demonstrated. In mammalian cells, the major Ag-NOR proteins were shown to be nucleolin and protein B23 [16, 17], but the corresponding proteins in plant cells have not been identified.

In our biological system, *Allium cepa*, we have identified a phosphorylated protein, enriched in the soluble nuclear fraction that is immunologically related to mammalian nucleolin, and a target of the Ag-NOR staining, which we have called NopA100 (González-Camacho, De Cácer, Cerdido and Medina, manuscript submitted for publication). Now, we have used an anti-NopA100, mono-specific, polyclonal antibody in order to identify all the spots that constitute this protein on bidimensional gels, obtained from the soluble nuclear fraction, coming from root cells in different proliferative situations. Thus, in the different samples, we have observed strong variations in the total levels of this protein as well as in its phosphorylation state. These results provide evidence for both the amounts of NopA100 and its phosphorylation state correlate with nucleolar activity and the regulation of the cell proliferation events.

2 Materials and methods

2.1 Biological material

Meristematic and nonmeristematic portions of onion (*Allium cepa* L.) roots were obtained from onion bulbs germinated in water. The meristematic cells were obtained from the first 3 mm of the root tip. After the meristematic cells were dissected out, an additional fragment of 3 mm was discarded, and the rest of the root was used for the nonmeristematic cells.

2.2 Antibody

The procedure for raising the polyclonal anti-NopA100 antibody used in this work is the same as that described previously [18] and will be published elsewhere (González-Camacho, De Cárcer, Cerdido and Medina, manuscript submitted for publication). Briefly, the purified protein obtained by gel electroelution was used as the antigen for immunization of rabbits. The anti-NopA100 IgG was concentrated by precipitation with 50% ammonium sulfate, dialyzed against PBS, purified by chromatography in a diethylaminoethyl-blue column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) concentrated by precipitation in 50% ammonium sulfate, and then dialyzed against PBS. The specificity of the antibody was confirmed in Western blots against the purified antigen and against nuclear samples from mammalian, yeast and other plant cells (results not shown).

2.3 Purification of nuclei

Nuclei were purified as described previously [13]. Root meristems were incubated in extraction medium (2% arabic gum, 1.25% ficoll, 2.5% dextran, 25 mM Tris HCl, 2.5 mM MgCl₂, 4 mM *n*-octanol, 6.8 mM diethyl pyrocarbonate, 30% glycerol, pH 7.4), homogenized in a high-speed blender (Ultraturrax; IKA, Labortechnik, Staufen, Germany) and filtered through three nylon cloth layers with pores of 100, 50 and 30 μ m, respectively. The filtrate was centrifuged at 800 \times *g* for 10 min. The crude nuclear pellet was resuspended in extraction medium, and then centrifuged again. Finally the pellet was resuspended in nuclei stock buffer (NSB: 10 mM Tris-HCl, 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM *n*-octanol, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.4). All buffers contained a cocktail of protease inhibitors (aprotinin, pepstatin, leupeptin and PMSF), and all procedures were performed at 0–4°C.

2.4 Nuclear fractionation

Nuclei were fractionated essentially as described by De Cárcer *et al.* [18]. Purified nuclei were first treated with 1% v/v NP-40 and 0.5% v/v sodium deoxycholate in NSB, for 10 min at 4°C with vortexing. The nuclei were then collected by centrifugation at 1000 \times *g* for 10 min. The pellet was resuspended in a low ionic strength buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), incubated for 1 h at 4°C, and then fractionated by centrifugation at 1000 \times *g* for 10 min. The supernatant, designated the S2 extract, was used for protein analysis. The cocktail of protease inhibitors mentioned in Section 2.3 was also used throughout this process.

2.5 SDS-PAGE

Proteins from the soluble nuclear fraction were precipitated by 7% TCA at 0°C for 1 h. Following centrifugation at 10 000 \times *g* for 30 min, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of 3:1 v/v ethanol: ether at –20°C. After 2 h, protein was collected by centrifugation (20 000 \times *g*, 30 min) and the pellet was dried under vacuum. The protein pellet was dissolved in a sample buffer solution of 10% 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue. In some cases the protein pellets were sonicated three times for 1 s each, separated by cooling on ice, in a sample buffer solution to facilitate dissolution. Protein samples were separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide minigels (Bio-Rad) that were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.6 Two-dimensional gel electrophoresis

IEF was carried out with 100 μ g of protein using a Protean IEF cell (Bio-Rad) and 11 cm gel strips forming an immobilized linear pH gradient from 3–10 (IPG Ready-Strips). Strips were rehydrated for 12 h at 18°C at 50 V with rehydration buffer, containing 100 μ g protein. The rehydration buffer contained 40 mM Tris, 2 M thiourea, 7 M urea, 4% Triton X-100, 100 mM DTT, 2% carrier ampholytes (pH 4–7 carrier ampholytes were mixed with pH 3–10 ampholytes at a 2:1 ratio) and 0.001% bromophenol blue. Focusing profiles for these strips included 15 min at 250 V followed by a rapid ramping to 8000 V and additional focusing at this level to accumulate 35 000 Vh. Current was limited to 50 μ A per strip throughout the run and temperature was maintained at 18°C. Upon completion of IEF, the IPG Ready-Strips were incubated first with equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol) containing 130 mM DTT for 10 min and then with equilibration buffer containing 135 mM iodoacetamide for 10 min. The strips were plated on top of 16 cm vertical 12% SDS polyacrylamide gels and the proteins fractionated by electrophoresis in the second dimension.

In some experiments, the gels were fixed and stained using a modification of the silver staining method described by Heukeshoven and Dernick [19]. Proteins were first fixed using a solution of ethanol:acetic acid:distilled water (50:10:40) for 40 min, followed by a second treatment with the same reagents (5:1:94) for 30 min. After three 5 min washings with distilled water, the gel was plunged into a solution of Na₂S₂O₃ (0.2 g/L) for 1 min, and then washed with bidistilled water three times, 30 s each. The gel was then stained in a solution of 12 mM sil-

ver nitrate and 0.11% formaldehyde for 30 min in the dark, and finally developed with 0.28 M Na_2CO_3 and 0.018% formaldehyde. The reaction was stopped with 5% acetic acid. Stained gels were analyzed using the program PDQuest (Bio-Rad). Other gels were subject to Western analysis (see Section 2.8). For each condition analyzed, 2-DE gels were made in triplicate from three independent protein extractions.

2.7 Protein measurement

Protein concentration was measured according to Bradford [20] using protein samples dissolved as described in Section 2.6 except that bromophenol blue was omitted from the sample buffer solution. Bovine serum albumin was used as a standard.

2.8 Two-dimensional Western blotting

Two-dimensional polyacrylamide gels were electroblotted at 100 V onto PVDF membranes for 1.5 h at 4°C. Subsequent procedures were done at room temperature, using PBS plus 0.05% Tween 20 (PBST). Membranes were blocked with this buffer supplemented with 2% dried nonfat milk for 1 h, incubated for 1 h in anti-NopA100 antibody diluted 1:1000 in blocking solution, and then the membrane was incubated for 1 h in secondary antibody (antirabbit peroxidase-conjugated), diluted 1:5000 in the same solution. The filters were washed three times with PBST for 10 min between each step. The immune complexes were visualized with enhanced chemiluminescence using the ECL reagent kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

2.9 Ag-NOR staining

Ag-NOR proteins blotted on PVDF membranes were detected as described by Hozák *et al.* [14]. The membranes were stained in plastic Petri dishes. All solutions were prepared in freshly deionized water, to avoid non-specific silver reactions. Membranes were washed successively with PBST, PBS, deionized water, 20% ethanol and deionized water, 10 min each. The Ag-NOR staining solution consisted of a 2:1 v:v ratio mixture of solution A (50% AgNO_3 in deionized water) and solution B (2% gelatin, 1% formic acid in water). Samples were stained 15 min in staining solution at room temperature under continuous stirring in the dark. The reactions were stopped by washing in water.

2.10 Dephosphorylation: Treatment with alkaline phosphatase

Freshly prepared S2 nuclear protein extract, containing the cocktail of protease inhibitors mentioned in Section 2.3, was incubated with alkaline phosphatase (20 units/ μL) (Roche, Basel, Switzerland), at a dose of one unit enzyme per μg of protein, as described by the supplier. The reactions were carried out for 1 h at 37°C, and stopped by the addition of ice-cold 7% TCA. To control for the specificity of the phosphatase treatment, parallel samples were incubated under the same conditions without the enzyme. The dephosphorylated extract was subjected to 2-DE, and NopA100 was revealed by Western blotting with the same anti-NopA100 antibody as described in Section 2.8.

2.11 Immunogold electron microscopy

Immunogold electron microscopy was carried out as described previously [13]. Briefly, onion root tips were fixed in 4% formaldehyde (freshly prepared from paraformaldehyde) plus 0.5% glutaraldehyde in PBS, for 2 h, at room temperature, dehydrated in an ethanol series, embedded in LR White (London Resin, Berkshire, UK) and ultrathin sectioned. Sections, mounted on formvar-coated nickel grids, were incubated for 30 min in a blocking solution containing 1% BSA in PBST, then in the first antibody, anti-NopA100, diluted 1:50 in blocking solution for 1 h, and finally in goat antirabbit immunoglobulin G (IgG) coupled with 10 nm colloidal gold particles, diluted 1:50 in the same solution. Between incubations, grids were rinsed in PBST and finally counterstained with 2% aqueous uranyl acetate for 30 min in the dark and examined in a Philips Eindhoven, The Netherlands 300 transmission electron microscope, operating at 80 kV. Negative controls consisted of the omission of the first antibody.

3 Results

3.1 1-D gel analysis of the soluble fraction (S2)

Equal numbers of purified nuclei from onion root meristematic (undifferentiated, highly proliferating) and parenchymatic cells (differentiated, nonproliferating) were subjected to sequential protein extraction. Interestingly, there were substantial differences regarding the nuclear size and the relative contribution of the nucleus to the cellular mass between the two cell types. Root meristems yielded 40×10^6 nuclei per gram of fresh tissue, whereas one gram of fresh parenchymatic tissue only yielded 18×10^6 nuclei. However, the protein mass per nucleus

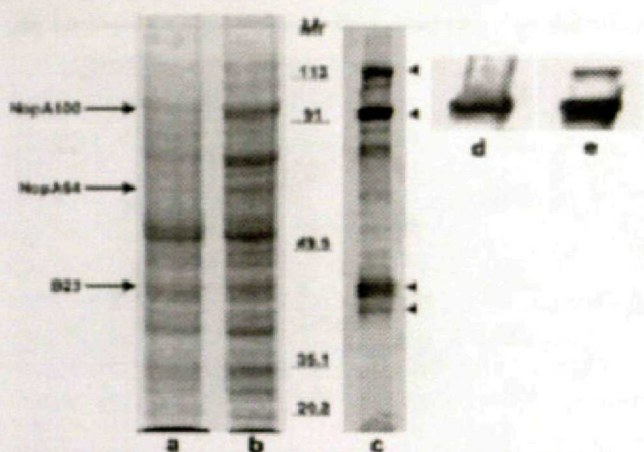


Figure 1. SDS-PAGE visualized by Coomassie blue staining (a, b), AgNOR staining (c) and Western blotting with anti-NopA100 antibody (d, e). The same amount of proteins from the soluble nuclear fraction from either differentiated cells of the onion root (a), or undifferentiated root meristematic cells (b), were separated by 1-D SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue. The sample coming from highly proliferating cells showed more bands, some of them densely stained. In general, the major bands of the meristematic sample appeared considerably reduced in intensity in the nonmeristematic sample, except a 53 kDa band which appears as the major protein of the soluble nuclear extract from differentiated cells (a). Some nucleolar proteins relevant for their relationship with cell proliferation, such as NopA100 (nucleolin-like), NopA64 (related to nucleolin), and B23, were identified (arrows). This identification was facilitated by the use of AgNOR staining on meristematic cells, which detected NopA100, the B23 onion homologue (two bands differing in intensity) and a protein of 120 kDa (c, arrowheads). Western blotting with an anti-NopA100 polyclonal antibody clearly detected the target protein in differentiated (d) as well as in meristematic cells (e), but the intensity of the band in the proliferating sample was considerably higher than in the nonproliferating one. Furthermore, a band corresponding to the 120 kDa protein was detected in this experiment in meristematic cells, strongly suggesting that the 120 kDa protein is a precursor protein of NopA100. Molecular mass (M_r) markers are shown in kDa.

was rather similar in both tissues, namely 24 μ g of protein per million nuclei in the meristematic tissue and 21.7 μ g of protein per million of nuclei in the parenchymatic tissue.

Approximately equal amounts of protein soluble in a low ionic strength EDTA buffer (S2 extracts) were obtained from both cell types. Equal amounts of protein were then fractionated by SDS-PAGE, stained with Coomassie blue, and the bands quantified by densitometrical analysis. In the meristematic sample, we could detect as many as 26 bands in the range between 130 kDa and 27 kDa (Fig. 1, lane b), while in the nonmeristematic sample only 18

bands were detected (Fig. 1, lane a). In agreement with previous reports [13, 18], the major bands identified in meristematic cells showed a clear reduction in intensity (absolute and relative) in nonmeristematic cells.

Ag-NOR staining of nuclear proteins transferred to PVDF membranes revealed a discrete number of positively stained bands. The major bands were 120, 100, 45 and 43 kDa (Fig. 1, lane c). The major 100 kDa band corresponds to NopA100, the nucleolin-like protein characterized by our group in onion cell nucleoli (González-Camacho, De Cácer, Cerdido and Medina, submitted for publication). The levels of this protein are considerably higher in meristematic cells than in nonmeristematic, as evidenced after Coomassie blue staining (Fig. 1, lanes a and b) as well as after Western blotting with anti-NopA100 antibody (Fig. 1, lanes d and e). The same antibody also reacted with a band of 120 kDa in meristematic cells (Fig. 1, lane e), whereas this band was barely detectable in extracts of nonmeristematic cells (Fig. 1, lane d). It is possible that this band is a precursor protein of NopA100. On their part, the 45 and 43 kDa bands could be identified as two forms of the plant homologue protein of the mammalian B23, which was described in mammalian cells, after Ag-NOR staining, as composed by two forms, 38 and 37 kDa respectively [21]. Here, for the first time, the putative existence of a plant homologue of the nucleolar phosphorylated protein B23 is reported, since anti-mammalian B23 antibodies do not cross-react with plant proteins. Interestingly, plant B23 also appears as a double band, but the M_r value is far from that exhibited by mammalian counterparts. However, differences in M_r between homologous proteins in plant and animals have also been shown for fibrillarin, another major nucleolar protein [13, 22].

3.2 Comparison of 2-D gels of the S2 extract in two different proliferation conditions, meristematic versus nonmeristematic cells

The 1-D SDS-PAGE analyses described above in Section 3.1 demonstrated significant differences between the S2 fractions of meristematic and parenchymatic cell nuclei. In order to more clearly define these differences, and to determine if there were additional biochemical differences, e.g. phosphorylation, between the proteins in the two fractions, we have analyzed these fractions by 2-DE (IEF/SDS-PAGE). As we did in the SDS-PAGE study, the analysis by 2-DE consisted of the comparison (in triplicate) of protein samples (100 μ g each), from meristematic cells, and nonmeristematic cells of the root. Proteins were detected by the sensitive silver staining method. Comparison of the number of protein spots detected in the two samples revealed significant differences. The

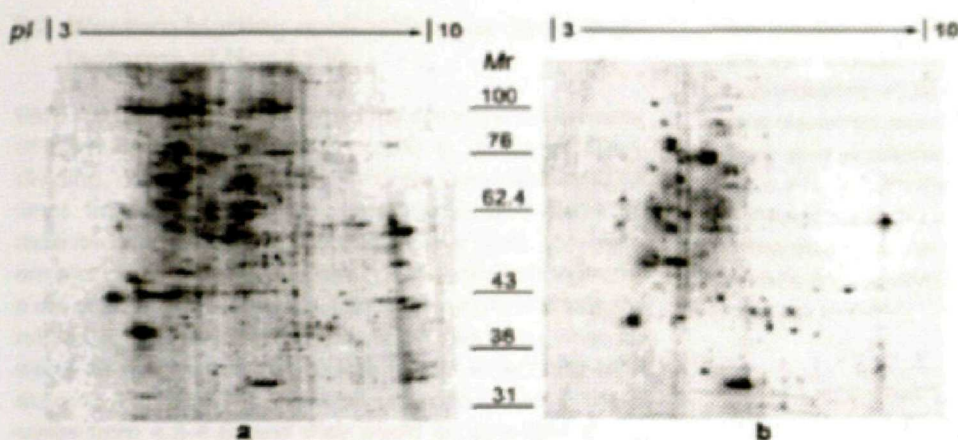


Figure 2. 2-D gel patterns, obtained after sensitive silver staining of soluble extracts of nuclear proteins from meristematic (a) and nonmeristematic (b) cell populations. Silver stained 2-DE gel maps, focused in the first dimension using a strip of 3–10 isoelectric point (pI) range, then electrophoresed on a 12% SDS gel. Molecular

mass (M_r) markers are shown in kDa. The spots in the study were distributed in a range between 130 kDa and 30 kDa. Remarkable differences as to the number, distribution and staining intensity of spots can be appreciated between the meristematic sample (a) and the nonmeristematic one (b).

extract from meristematic cells contained 384 spots ($SD \pm 6.5$), whereas the nonmeristematic sample contained only 209 spots ($SD \pm 7.4$) (Figs. 2 and 3). This indicates that the levels of a considerable number of nuclear RNPs are directly linked to the process of cell proliferation.

The M_r and the pI of each protein spot detected on the 2-D gel were calculated using five comigrating marker proteins. In both samples, we noticed that the detected spots were distributed in a range between 130 kDa and 30 kDa, and in the 3–10 pI range. The M_r and pI data were used to construct a 'virtual' 2-D gel of the samples.

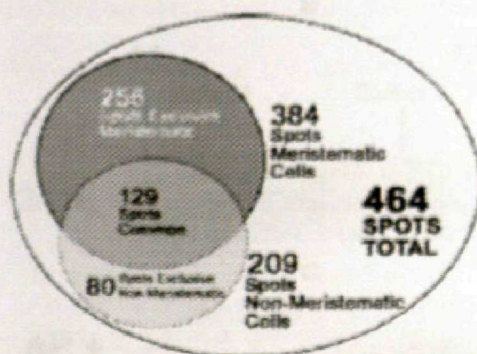


Figure 3. Comparative quantitative evaluation of the 2-DE patterns from the soluble nuclear protein extracts obtained from meristematic and nonmeristematic cells. Patterns of 2-DE gels from the two samples were superimposed by using the PDQuest software (Bio-Rad). This method allowed the production of a 'virtual' gel containing the spots belonging to either one or the other sample, and the identification of the spots which were represented in both patterns (whatever their staining intensity, which was hardly coincident) and those specific for only one of them. Numeric data resulting from this 'virtual' gel were graphically represented.

One-to-one comparison of meristematic and nonmeristematic 2-DE patterns indicated that a total of 464 individual spots could be discriminated in a 'virtual' gel obtained by addition of the patterns obtained from the proteins of the two cell types using PDQuest software. Interestingly, more than a half of the spots in the 'virtual' pattern (255 spots; 55% of the total) were specific for the meristematic sample, whereas 17% (80 spots) were only found in the extracts of differentiated cells. The remaining 129 spots (28%) had identical M_r and pI in both samples, though they often differed in staining intensity depending on the proliferative cell condition (Fig. 3). However, since silver staining is not quantitative, we did not attempt to quantify differences in protein amounts among these spots common to both samples.

In order to analyze differences in pI, spots were divided in three groups, namely 3–5 (acidic), 5.1–7 (acidic/neutral), and 7.1–10 (neutral/basic) pI range in each of the two samples (Table 1). This analysis demonstrated significant differences between the samples. Significantly, nearly half of the peptides of the extracts from meristematic cells were distributed in the extreme categories, while the majority of spots in the nonmeristematic sample (74.6%) were in the central (acidic/neutral) range.

Table 1. Distribution of the spots detected by 2-DE in three categories, according to pI, in the two different samples differing in cell proliferation ability

pI range	Meristematic	%	Nonmeristematic	%
3.0–5.0	97	25.2	36	17.2
5.1–7.0	214	55.7	156	74.6
7.1–10	73	19.0	17	8.1

3.3 Western blotting applications for detecting isoforms of NopA100

We used anti-NopA100 antibody to compare the behavior of this nucleolin-like nucleolar protein in dividing and non-dividing, differentiated cells. Proteins separated by 2-DE were transferred to PVDF membranes and NopA100 detected with anti-NopA100 antibodies (Fig. 4). The Western blot of the meristematic sample (Fig. 4a) demonstrated a set of 26 spots. Comparison of the Western blot with the original 2-DE gel demonstrated that these spots were the same as the cluster of 100 kDa identified with Ag-NOR staining (Fig. 4c). These spots were distributed in the *pI* range from 4.3–6.6, and they could be arranged in two clusters. In the more acid part of the *pI* range, the spots were close together, forming a 'protein train' (Fig. 4c, cluster 1). In the more neutral portion of the gel, individual spots appeared better differentiated (Fig. 4c, cluster 2).

Western blots of the S2 fraction from nonmeristematic cells (Fig. 4b) also contained a set of spots whose molecular mass is 100 kDa (Fig. 4e). However, in this case the *pI* range was abbreviated (4.8–6.1), and, more significantly,

the number of detected spots was reduced to 7. Again, the spots could be arranged in two clusters. One was concentrated at *pI* 5 (Fig. 4f, cluster 1) and the second was observed around *pI* 6 (Fig. 4f, cluster 2). These spots were always discrete. These data from 2-D electrophoresis correlate with the results from 1-D SDS-PAGE and the corresponding Western blotting indicating that NopA100 is the major protein of the S2 extract in proliferating cells, and its expression is greatly reduced in nonproliferating cells.

Since it was known that NopA100 was a highly phosphorylated protein, we hypothesized that NopA100 isoforms detected by 2-DE Western blotting might correspond to different states of phosphorylation of the protein. To test whether or not this hypothesis was true, we treated the S2 extracts from meristematic cells with alkaline phosphatase (described in Section 2.10) to dephosphorylate the proteins, and analyzed the proteins by 2-DE and Western blotting with anti-NopA100. As shown in Fig. 4e, the NopA100 spots were less heterogeneous after treatment with alkaline phosphatase, and the pattern shifted to-

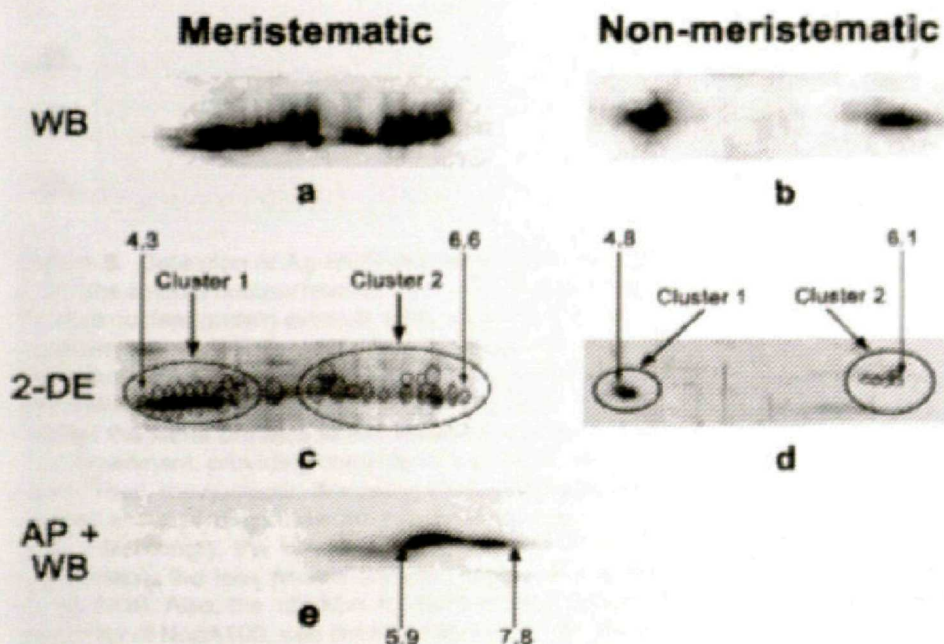


Figure 4. First row (a, b): Detection of the nucleolin-like nucleolar protein NopA100 by Western blotting (WB), using a specific polyclonal antibody, among nuclear soluble proteins in 2-DE maps obtained from the two model root cell types, namely meristematic (actively proliferating) and nonmeristematic (having low proliferative rate). Second row (c, d): Pattern of spots observed in 2-DE gels stained with silver of the same regions represented in (a) and (b), respectively. Third row (e): Western blotting with the same conditions of (a), but the protein extract was previously dephosphorylated by incubation with alkaline phosphatase. A large cluster of spots was immunodetected with anti-NopA100 in meristematic cells (a). The corresponding image of this cluster in the silver stained 2-DE gel (c) shows that it extends through a *pI* range of 4.3–6.6. A total of 26 spots could be identified, which could be grouped in two subclusters, the majority of them corresponding to the more acid condition. The situation was shown to be very different in nonmeristematic cells, in which the immunoreaction was much weaker (b), the *pI* range was shortened and the number of detected spots was drastically reduced to only 7, clearly separated into two categories according to their *pI* (d). Western blotting after dephosphorylation (e) shows a dramatic shortening of the *pI* of the target spots, as well as a displacement towards the basic region, which indirectly is evidence that the wide and numerous range of spots detected in the native extract corresponds to phospho-isoforms of the protein.

corresponding image of this cluster in the silver stained 2-DE gel (c) shows that it extends through a *pI* range of 4.3–6.6. A total of 26 spots could be identified, which could be grouped in two subclusters, the majority of them corresponding to the more acid condition. The situation was shown to be very different in nonmeristematic cells, in which the immunoreaction was much weaker (b), the *pI* range was shortened and the number of detected spots was drastically reduced to only 7, clearly separated into two categories according to their *pI* (d). Western blotting after dephosphorylation (e) shows a dramatic shortening of the *pI* of the target spots, as well as a displacement towards the basic region, which indirectly is evidence that the wide and numerous range of spots detected in the native extract corresponds to phospho-isoforms of the protein.

wards the neutral-basic region. These data demonstrate that the more acidic NopA100 spots did correspond to phosphorylated variants of the protein. When the alkaline phosphatase was omitted from the incubation, the NopA100 protein pattern was indistinguishable from that of the starting material (not shown here).

3.4 Determination of the *pI* of Ag-NOR proteins from 2-DE Western blotting

When Ag-NOR staining proteins from 2-DE of S2 extracts of meristematic cells were analyzed, four major proteins of 120, 100, 64 and 43 kDa were identified (Fig. 5). The *pI* range of the 100 kDa protein was determined to be between 4.3–6.0, and corresponded to the series of protein spots detected by Western blotting with anti-NopA100

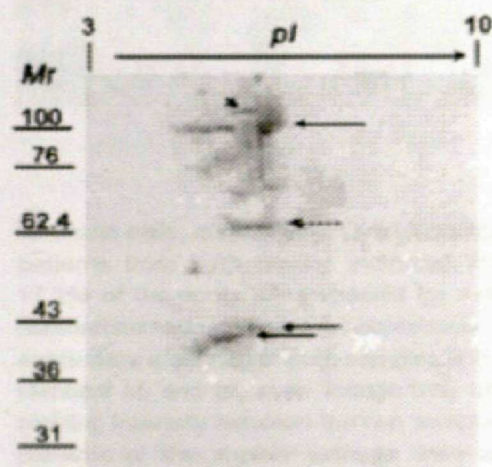


Figure 5. Detection of Ag-NOR stained proteins after 2-DE of the soluble nuclear fraction from meristematic cells. Soluble nuclear protein extracts were separated by 2-DE, transferred onto PVDF membranes and then stained by the selective Ag-NOR stain. The corresponding total protein staining is shown in Fig. 2a. 2-D Ag-NOR staining reveals the same proteins which appeared stained in the 1-D experiment, providing complementary information on them. Thus, the nucleolin-like protein NopA100 appeared stained with a *pI* range between 4.3–6.0 (long arrow at the top). Interestingly, the less acidic isoforms of NopA100 (presumably the less phosphorylated) were not stained by Ag-NOR. Also, the 120 kDa Ag-NOR protein, putative precursor of NopA100, was detected as a spot with a *pI* of 5.1 (arrowhead). A protein of 64 kDa and 4.9–5.7 *pI* range corresponds to the previously described nucleolin-related NopA64, and could be considered as a proteolytic fragment of NopA100 (dashed arrow). Finally, the clusters of 43–42 kDa, displaying *pI*s between 4.9 and 5.1, and 4.3–4.9, respectively (a pair of arrows at the bottom) correspond to the onion homologues of the mammalian nucleolar phosphoproteins B23. Markers of molecular mass (*M_r*) are expressed in kDa.

antibody. Another protein detected by Western blotting of SDS-PAGE with this antibody was the 120 kDa protein. Ag-NOR staining of 2-DE membranes demonstrated that a protein of the same mass had a *pI* of 5.1, and was slightly extended in the horizontal dimension. Interestingly, a protein previously described by our group as immunologically related to nucleolin, NopA64 [18], was also detected by 2-DE Ag-NOR staining, with a *pI* between 4.3–4.9. This protein could correspond to a fragment of NopA100, a result of its physiological proteolysis, similar to the process which has been described both in mammalian cells [23, 24] and in onion cells (González-Camacho and Medina, manuscript in preparation). A protein at the same level of 64 kDa was also detected after Ag-NOR staining of mammalian cells in 1-D Western blots [21]. Finally, the onion homologues of the mammalian nucleolar protein B23 were also detected by Ag-NOR staining. The band of 43 kDa consisted of a cluster of spots with a very limited *pI* range (4.9–5.1), while the second band of 42 kDa, demonstrated a more extended *pI* range (4.3–4.9) (Fig. 5).

3.5 Immunocytochemical ultrastructural localization of NopA100

We have immunolocalized NopA100 in onion cells at the electron microscope level (Fig. 6). The labeling is clearly localized to the nucleolus, only a few particles were occasionally seen in the remainder of the nucleus or the cytoplasm. Furthermore, the nucleolar labeling appeared to be mostly over the dense fibrillar component (DFC) and the periphery of the fibrillar centers (FC). This distribution reflects the functional role of this protein in transcription of ribosomal genes and in the early processing of the pre-ribosomal precursor in the nucleolus.

4 Discussion

In this work we have analyzed the 2-D pattern of the soluble fraction of nuclear proteins from dividing (meristematic) and nondividing (nonmeristematic) onion root cells. This fraction is enriched in RNPs active in nuclear RNA metabolism, including nucleolar proteins involved in pre-ribosomal RNA synthesis and processing. In order to identify and characterize those proteins related to the mechanisms of cell proliferation and cell cycle progression, a comparison was made between the protein pattern shown by actively proliferating cells (meristematic) and nonproliferating cells (differentiated) from the onion root. Silver staining of the proteins fractionated by IEF/SDS PAGE made it possible to detect as much as 384 and 209 spots in samples from meristematic and nonmer-

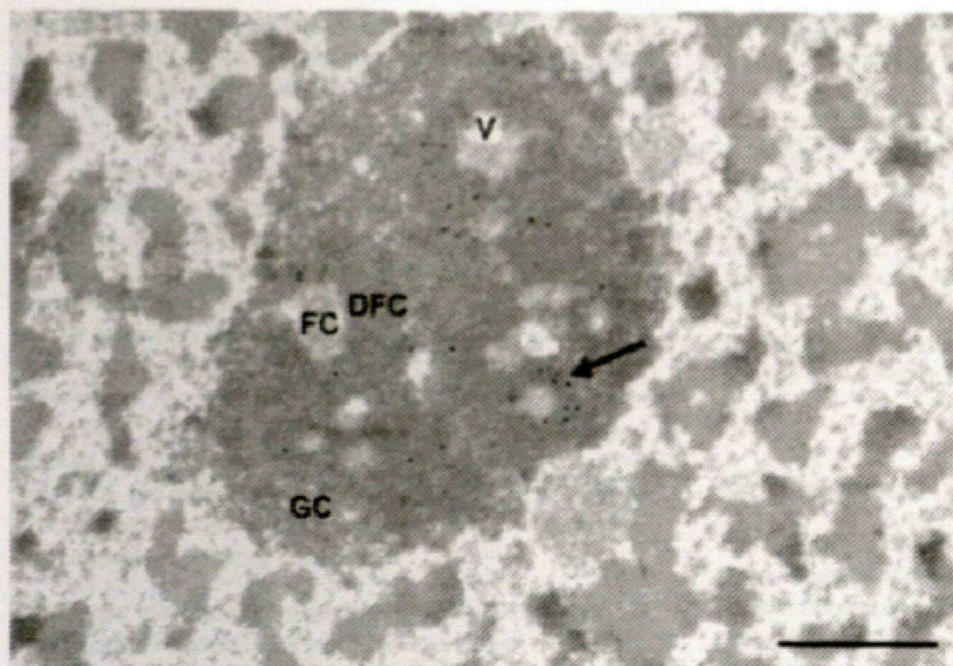


Figure 6. Electron microscopic immunogold localization of NopA100 in the onion meristematic cell nucleolus. Labeling appeared located exclusively within the nucleolus. Among nucleolar subcomponents, labeling was detected either as clusters of gold particles (arrows), or as single particles, located in the dense fibrillar component (DFC), mostly at the surroundings of fibrillar centers (FC). GC: granular component; V: nucleolar vacuole. Bar indicates 1 μ m.

istematic cells, respectively. Overall comparison of 2-DE patterns from both tissues indicated that 54.9% and 17.2% of the spots were specific for meristematic and nonmeristematic cell nuclei, respectively. The remaining spots were identified in both samples and demonstrated identical M_r and pI , even though they often differed in staining intensity between the two samples. The 2-D gel patterns of the nuclear extracts were analyzed using PDQuest software generating reference maps that have provided us with information suggesting mechanisms that regulate these proteins.

Western blots of the 2-DE patterns with an anti-NopA100 antibody provided substantial information on the behavior of this nucleolar protein in relationship to cell proliferation [4, 18, 25–27]. In particular, we have found evidence of both qualitative and quantitative differences in the two cellular stages studied. Our data demonstrate that NopA100 is much more abundant in proliferating cells than in nonmeristematic. Further, the number of 2-DE spots corresponding to isoforms of this protein is much higher in meristematic cells. As this heterogeneity is reduced upon treatment with alkaline phosphatase, we would suggest that most of these isoforms represent different phosphorylation states of the protein. This conclusion is consistent with previous studies dealing with the characterization of nucleolin and nucleolin-like proteins. In every taxonomic group in which this protein (or its homologues) has been identified, it has been demonstrated to be a phosphoprotein [10, 27–32]. Consistent with these

observations, we have found that NopA100 is the most highly phosphorylated protein in the S2 extract from proliferating onion cell nuclei (González-Camacho, De Cárcer, Cerdido and Medina, manuscript submitted for publication). Since NopA100 displays a wide range of phosphorylation states in proliferating cells, and this range is severely shortened in nonproliferating cells, we would suggest that the activity of the protein is modulated by phosphorylation. Interestingly, our data provide evidence for a precursor of NopA100. This protein, consisting of two spots of about 120 kDa was detected by Western blotting with anti-NopA100 antibody, and also by Ag-NOR staining, in both cases with the same M_r and pI . This protein was not detected in extracts from differentiated cells. It is interesting to note that a precursor of nucleolin has been described in some cases [33]. Immunocytochemical analysis using resin-embedded tissue, demonstrated that NopA100 localizes in nucleolar subdomains consistent with a putative role in pre-rRNA transcription and early processing [4].

The sum of our observations are consistent with the hypothesis that NopA100 is the onion homologue of mammalian nucleolin. The two proteins demonstrate nearly identical nucleolar localization, they have similar M_r and pI , and both are phosphoproteins. However, the definitive proof of this hypothesis awaits the demonstration of the sequence of NopA100. In addition, molecular clones of the mRNA for NopA100 will allow us to confirm or discard the identity of the 120 kDa protein as a true precursor of

NopA100. It will also be of interest to subject the Ag-NOR staining spots of 43 and 42 kDa which were putatively identified as the homologues of the mammalian protein B23.

The Ag-NOR staining method has been a useful tool for the identification of the major phosphoproteins related to the nucleolar organizer regions (NOR). In this regard, it is interesting to note that the bidimensional pattern of onion proteins obtained by Ag-NOR staining in our laboratory is similar (although not identical) to the pattern reported for HeLa cells by Hernandez-Verdun [21]. In spite of some differences, the use of Ag-NOR and 2-DE in the analysis of nuclear proteins in different biological systems would appear to provide both markers of cell proliferation and evidence for evolutionary conservation. These features can be used for the characterization of respective homologous proteins in other databases.

Proteomic methods have been used for direct identification of proteins from large genomic databases using peptide sequence tags obtained by MS/MS. These methods have been used in *Arabidopsis thaliana* [34–36] as well as in humans [7, 8, 37–39]. However, their use has been largely facilitated by the existence of sequenced genomes for the biological models that were the object of those studies [40].

Since O'Farrell introduced 2-D PAGE [41], this method has been recognized as the most effective, rapid procedure for separating proteins. For comparative functional proteomic studies in plants, such as that reported here, the 2-D patterns have yielded useful information on the hypothesized protein changes. This information provides a starting point for the identification of those spots that are candidates for functionally significant proteins. This advanced objective can be achieved by different available methods, such as internal peptide microsequencing [42], or Edman sequencing, and mass spectrometry (MALDI-TOF MS or MS/MS) [43, 44].

The now classical proteomic approach to obtaining information on nucleolar proteins related to cell proliferation events in a species without available genomic information, using the random spots analysis, would have involved an enormous amount of work if each spot from the total nuclear or nucleolar proteome were to be analyzed and compared with each other and/or with the available information from putative homologous proteins of more or less related species [45]. Although we recognize that the final compilation of an organism proteome will require the correlation of the partial sequence analysis of the expressed proteins with genomic data, our strategy provides a rapid technique for the initial identification of proteins whose regulation may in fact correlate with cell

proliferation. The selection of candidate spots that correspond to proteins relevant for our objectives has been largely facilitated by the following strategy: (a) the use of a fraction of nuclear proteins which is known to be enriched in ribonucleoproteins; and (b) the use of the selective Ag-NOR staining method, known to detect nucleolar proteins related to cell proliferation. When we combined our Ag-NOR staining of the S2 fractions with Western blots using a monospecific antibody against NopA100, we were able to confirm that Ag-NOR staining of the 2-DE gels had identified this homologue of mammalian nucleolin.

5 Concluding remarks

This identification of candidate spots must be followed by the utilization of other techniques, e.g. Western blotting or mass spectrometric analysis of the spots previously selected, to demonstrate identity or to provide sequence data necessary for the identification of the protein in question. Such a study will include a search for homologues in available databases. Such an effort requires technology that is beyond the reach of many laboratories. In our opinion the combination of protein fractionation based on solubility or another rapid fractionation protocol, 2-DE and silver staining provides an advantageous method with which to characterize a cell type or obtain evidence with respect to cell growth, etc. The characterization of cell types using subproteomes obtained with functional criteria, will facilitate the search, identification and characterization of functionally relevant proteins.

We wish to express our gratitude to Prof. Lawrence I. Rothblum for extensive revision of the manuscript, including its English style. The technical assistance of Ms. Mercedes Camota is gratefully acknowledged. This work was supported by a grant from the Spanish National Plan for Research, Development and Innovation, Grant No. ESP1999-0379-C02-02 and No. ESP2001-4522-PE.

Received April 30, 2003

Revised August 14, 2003

Accepted September 5, 2003

6 References

- [1] Hadjilov, A. A., *Cell Biol. Monogr.* 1985, 12, 1–268.
- [2] Srivastava, M., Pollard, H. B., *FASEB J.* 1999, 13, 1911–1922.
- [3] Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., Campos, I., *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, E107–E112.
- [4] Medina, F. J., Cerdido, A., De Cárcer, G., *Eur. J. Histochem.* 2000, 44, 117–131.

- [5] Olson, M. O. J., in: Strauss, P. R., Wilson, S. H. (Eds.), *The Eukaryotic Nucleus. Molecular Biochemistry and Macromolecular Assemblies*, The Telford Press, Caldwell, New Jersey 1991, pp. 519–559.
- [6] Derenzini, M., *Micron* 2000, 31, 117–120.
- [7] Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K. et al., *Curr. Biol.* 2002, 12, 1–11.
- [8] Scherl, A., Couté, Y., Déon, C., Callé, A. et al., *Mol. Biol. Cell* 2002, 13, 4100–4109.
- [9] Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C. et al., *Electrophoresis* 1999, 20, 2013–2026.
- [10] Bourbon, H. M., Bugler, B., Calzergues-Ferrer, M., Amalric, F., *FEBS Lett.* 1983, 155, 218–222.
- [11] Dunham, V. L., Bryant, J. A., in: Hall, J. L., Moore, L. (Eds.), *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*, Academic Press, London 1983, pp. 237–275.
- [12] Schnapp, A., Pflegerer, C., Rosenbauer, H., Grummt, I., *EMBO J.* 1990, 9, 2857–2863.
- [13] Cerdido, A., Medina, F. J., *Chromosoma* 1995, 103, 625–634.
- [14] Hozák, P., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., *J. Histochem. Cytochem.* 1992, 40, 1089–1096.
- [15] Roussel, P., Sirri, V., Hernandez-Verdun, D., *J. Histochem. Cytochem.* 1994, 42, 1513–1517.
- [16] Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M. C., Hernandez-Verdun, D., *Cytometry* 1997, 28, 147–156.
- [17] Sirri, V., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., *Micron* 2000, 31, 121–126.
- [18] De Cárcer, G., Cerdido, A., Medina, F. J., *Planta* 1997, 201, 487–495.
- [19] Heukeshoven, J., Dernick, R., *Electrophoresis* 1988, 9, 28–32.
- [20] Bradford, M., *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- [21] Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., *Exp. Cell Res.* 1994, 214, 465–472.
- [22] Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H., Busch, H., *Biol. Cell* 1985, 54, 123–134.
- [23] Bouche, G., Calzergues-Ferrer, M., Bugler, B., Amalric, F., *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 3025–3035.
- [24] Chen, C. M., Chiang, S. Y., Yeh, N. H., *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 7754–7758.
- [25] Belenguer, P., Calzergues-Ferrer, M., Labbé, J. C., Dorée, M., Amalric, F., *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10, 3607–3618.
- [26] Lapeyre, B., Bourbon, H. M., Amalric, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 1472–1476.
- [27] Bögre, L., Jonsak, C., Mink, M., Meskies, I. et al., *Plant Cell* 1996, 8, 417–428.
- [28] Calzergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F. et al., *Biochemistry* 1987, 26, 7876–7883.
- [29] Gull, M. P., Faubladiet, M., Sicard, H., Calzergues-Ferrer, M., *Chromosoma* 1997, 105, 532–541.
- [30] Calzergues-Ferrer, M., Mariottini, P., Curie, C., Lapeyre, B. et al., *Genes Dev.* 1989, 3, 324–333.
- [31] Cserrny, P., Schnaider, T., Cheatham, B., Olson, M. O. J., Kahn, C. R., *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 9747–9752.
- [32] Rao, S. V. V., Marmack, M. D., Olson, M. O. J., *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 15035–15041.
- [33] Bugler, B., Calzergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H. M., Amalric, F., *Eur. J. Biochem.* 1982, 128, 475–480.
- [34] Prime, T. A., Sherrier, D. J., Mahon, P., Packman, L. C., Dupree, P., *Electrophoresis* 2000, 21, 3488–3499.
- [35] Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Robertson, D. et al., *Electrophoresis* 2002, 23, 1754–1765.
- [36] Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M. et al., *Plant Physiol.* 2001, 126, 835–848.
- [37] Yanagida, M., Shimamoto, A., Nishikawa, K., Furuichi, Y. et al., *Proteomics* 2001, 1, 1390–1404.
- [38] Bergquist, J., Gobom, J., Blomberg, A., Roepstorff, P., Ekman, R., *J. Neurosci. Methods* 2001, 109, 3–11.
- [39] Küster, B., Mortensen, P., Andersen, J. S., Mann, M., *Proteomics* 2001, 1, 641–650.
- [40] Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 14440–14445.
- [41] O'Farrell, P. H., *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.
- [42] Costa, P., Pionneau, C., Bauw, G., Dubos, C. et al., *Electrophoresis* 1999, 20, 1098–1108.
- [43] Shen, S., Matsubae, M., Takao, T., Tanaka, N., Komatsu, S., *J. Biochem.* 2002, 132, 613–620.
- [44] Chang, W. W., Huang, L., Shen, M., Webster, C. et al., *Plant Physiol.* 2000, 122, 295–318.
- [45] Liska, A. J., Shevchenko, A., *Proteomics* 2003, 3, 19–28.
- [46] van Wijk, K. J., *Plant Physiol.* 2001, 126, 501–508.

Nucleolar Proteins and Cell Proliferation in Plant Cells

Francisco Javier Medina and Fernando González-Camacho

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Velázquez 144, E-28006 Madrid, Spain

Running Title: Plant Cell Nucleolar Proteins

Correspondence to:

Dr. Francisco Javier Medina
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)
Velázquez 144
E-28006 Madrid
Spain

Tel.: +34 91 561 18 00, ext. 4261

Fax: +34 91 562 75 18

E-mail: fjmedina@cib.csic.es

The nucleolus is a non-membranous, highly organized, and functionally specialized structure within the nucleus. It is the site of ribosome biogenesis, where ribosomal RNA is transcribed and processed, and ribosomal proteins are assembled into ribosomes. The nucleolus is a dynamic structure that can change in size and number in response to cellular growth and differentiation. It is a key organelle for cell proliferation, as it is essential for the production of ribosomes, which are necessary for protein synthesis and cell growth. The nucleolus is also involved in other cellular processes, such as the regulation of gene expression and the response to stress. The study of nucleolar proteins and their functions is important for understanding the basic biology of cells and the mechanisms of cell proliferation.

NUCLEOLIN

This phosphoprotein is the most abundant protein in the nucleolus. It is a highly conserved protein that is found in all eukaryotic cells. Nucleolin is a multifunctional protein that is involved in a wide range of cellular processes, including ribosome biogenesis, gene expression, and cell proliferation. It is a key component of the nucleolar structure and is essential for the normal function of the nucleolus. The study of nucleolin and its functions is important for understanding the basic biology of cells and the mechanisms of cell proliferation.

ABSTRACT

The name "Nucleolar Proteins" refers to proteins that can be localized *in situ* in the nucleolus, they take a part in ribosome biogenesis, but they are not constituents of the mature ribosome. Some nucleolar proteins interact with factors or mechanisms controlling cell proliferation and cell cycle progression, thus linking these crucial cellular processes with ribosome biogenesis. The most important protein of this group is nucleolin, the major nucleolar protein of actively proliferating cells. It is a multifunctional protein, associated with different steps of ribosome biogenesis, from transcription to nucleolus-cytoplasmic shuttling. Nucleolin undergoes posttranslational modifications which modulate its functional role, such as phosphorylation, in which kinases involved in cell cycle control, namely cdc2 kinase and casein kinase 2 are the agents. Other nucleolar proteins which were described and characterized in plant cells are also reviewed, such as fibrillarin, the complex of RNA polymerase I and its transcription factors (especially upstream binding factors), B23, Nopp140 and a subgroup of nucleolar proteins which, like nucleolin, are detected by the cytochemical staining method called "Ag-NOR" (silver staining of the nucleolar organizer), a popular procedure for estimating the cell proliferation capabilities. A considerable advance in solving the pending questions of this research field will be done in an immediate future with the application of modern proteomic technologies, whose potentiality in plants, mostly in relationship with the availability or not of sequenced genomes, is analyzed in the final section of the paper.

INTRODUCTION

The nucleolus is a nuclear prominent organelle specialized in assembling the cellular machinery for the biogenesis of cytoplasmic ribosomes. All steps of the process are organized in this nuclear territory, from the transcription of rRNA genes to the export of the mature products to the cytoplasm. Throughout the different steps of ribosome synthesis, many proteins play specialized roles either as enzymes, or regulatory factors, or even assuring the structural arrangement of the process. In general, two main groups can be made with the proteins present in the nucleolus: one group comprises the proteins which will be present in mature ribosomes, as constituting elements; these are called "ribosomal proteins". The second group is formed by proteins which associate to ribosomal precursors only in a transitory way, while they play their role, but they never leave the nucleolus, and, consequently, they cannot be retrieved from mature ribosomes. They are known as "nucleolar nonribosomal proteins" or, simply, as "nucleolar proteins". Only a few of these nucleolar proteins have been well characterized, and the mechanisms by which they function are not entirely defined. This group includes proteins simultaneously connected to ribosome biogenesis and to cell proliferation and cell cycle regulation, such as nucleolin, fibrillarin and B23. This simultaneous connection is of the highest interest, since it allows the study of a single cellular process in relationship with the general functional strategies of the cell. Otherwise, this provides highly valuable nucleolar markers for estimating the cellular proliferation status and the cell cycle progression.

NUCLEOLIN

This phosphoprotein was first identified and sequenced in mammals [1], although it was evidenced that it is conserved in plants [2, 3, 4, 5, 6] and yeast (NSR1 and GAR2) [7, 8] with a high degree of structural and functional homology. Originally it was called C23 [9].

Nucleolin is the major nucleolar protein of actively proliferating cells, in which it accounts for 10% of the total protein content of the nucleolus, whereas its levels dramatically

VKLAKAGKNQGDPPKMAPPPKEVEEDSEDEEMSEDEEDDSSGEEVVIPOKKGGKAAATS
AKKVVSPTKKVAVATPAKKA AVTPGKKAAATPAKKT VTPAKAVTTPGKKGATPGKALV
142 170
ATPGKKGA AI PAKGAKNGKNAKKEDSDEEEDDDSEDEEDEDED EDEDEIEPAMKAA
184 208 233
AAPASEDEDEDDEDDEDDEDDDDDEEDDSSEEEAMETTPAKGKKA AKVVVPVKA KNVAEDED
270
EEDEDED EDDDDDEDDEDDEDDEDEEEEEEEEEEPVKEA PGKRKKEMAK QKAAPEAKKQ
306
KVEGTEPTTA FNLFVG NLFNFKSA PELKTGISDVFA KNDLAVVDVRIGMTRKFGYVD FE
382 392
SAEDLEKALELTGLKVFGNE IKLEKPKGKDSKKERDARTLLAKNL PYKVTQDELKEVFE
465
DAAEIRLVSKDGKSGIAYIEFKTEADA EKTFEEKQGT EIDGRSISLYYTGEKGONQDY
485
RGGKNSTWSGES KTLVL SNLSYSATEETLQE VF EKATFIKVPQNQNGKS KGYAFIEFAS
559 571
FEDA KEALNSCNKRE IEGRAIRLELQGPRGSPNARSQP SKTLFVKGLSED TTEETLKES
643
FDGS VRARIVTDRET GSSKGF GFVDFNSEEDAKEAMEDGE IDGNKV TL DWAKPKGEGGF
694 706
GGRGGGRRGGFGGRGGGRGGRRGGFGGRGRGGFGGRGGGG DHKP OGKKTKEFE

The main difference between the mammalian nucleolin and the plant and yeast nucleolin-like proteins is the existence of only two RRM's in the latter.

Nucleolin is organized in structural domains which, in turn, reflect different functional activities (Fig. 1). This modular structure can also be found in other nucleolar proteins, such as fibrillarin and B23 (see following sections). In the case of nucleolin there is a tripartite structure: the amino terminal domain contains a series of acidic sequences, interspersed with basic regions which are variable in number depending on the species. This protein segment contains many potential phosphorylation sites, which may be targets of cdc2 kinase or casein kinase 2 (CK2) [10, 11], and also contains a bipartite nuclear localization signal. The central domain contains four conserved motifs of RNA binding (RNA-binding domains – RBDs, or RNA recognition motifs – RRM) in vertebrates, and only two of them in plants and yeast. Finally, the carboxi-terminal domain appears to be highly conserved between species and it is rich in the aminoacids glycine and arginine (GAR domain) [12]. Both amino- and carboxi-terminal domains mediate protein-protein interactions, for instance with H1 histone, U3snoRNPs and ribosomal proteins [13, 14, 15, 16]. Otherwise, GAR domain may also interact unspecifically with single-stranded nucleic acids [17]. The central region mediates interactions with pre-rRNA by means of the RRM. A considerable list of proteins has been described in numerous organisms showing functional and/or structural relationships with nucleolin. These proteins are known, in general, as “nucleolin-like” proteins [18]. Aminoacid sequences of some of them are publicly available in Swissprot and TrEMBL databases (Table 1).

Access Number	Organism	Name	No. of aminoacids
P19338	Human	Nucleolin (C23)	706
P15771	Chicken	Nucleolin	694
P08199	Hamster	Nucleolin	713
P09405	Mouse	Nucleolin	706
P13383	Rat	Nucleolin	712
P20397	<i>Xenopus laevis</i>	Nucleolin	650
P27476	<i>S. cerevisiae</i>	NSR1	414
P41891	<i>S. pombe</i>	Gar2	500
Q27199	<i>Tetrahymena thermophila</i>		476
Q9LIH8	<i>Arabidopsis</i>	Nucleolin-like	610
Q40363	Alfalfa	NuMsl	635
Q41042	Pea		611
Q8LNZ4	Tobacco	Nucleolin	620
AAO22235	Carp	Nucleolin	693
Q9U8P6	<i>Ciona intestinalis</i>	Nucleolin-like	529
Q8QFS6	<i>Triturus carnifex</i>	Nucleolin Fragment	338
Q8IS70	<i>Euprymna scolopes</i>	Nucleolin Fragment	161
Q95PU8	<i>Chironomus tentans</i>	Nucleolin Fragment	513
Q9I9I1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Nucleolin Fragment	255

Table 1.- Access numbers to Swiss-Prot or TrEMBL databases of nucleolin or nucleolin-like proteins from different organisms. Full information can be retrieved from the following URLs:

<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/access.html>

<http://us.expasy.org/sprot>

<http://srs.embl-heidelberg.de:8000/>

The modular structure of nucleolin is a reflection of its multifunctionality. Nucleolin functional roles in modulation of ribosomal chromatin structure, rDNA transcription, early transcript processing, ribosome assembly and nucleolus-cytoplasm shuttling have been described, and even some extranucleolar functions, such as RNA polymerase II transcription regulation and a certain role as a constituent of the mRNA "spliceosome" have recently been attributed to it [19]. With regards to its role in pre-rRNA processing (the best known of its functions), it has been proposed that nucleolin could be one of the first factors taking part in this process; nucleolin could interact with pre-rRNA transcript and take a part in the formation of the processing complex, by recruiting different factors, such as U3 snoRNP [15]. Nucleolin could bind 5' external transcribed spacer (ETS) through the RNA-binding domains, and this nucleolin-pre-rRNA binding could be a prerequisite for the first processing step, which consists of the excision of 5'ETS. The role of nucleolin could be decisive in promoting a secondary structure in pre-rRNA, so that the correct folding of pre-rRNA would make possible its processing [20, 21, 22].

Regarding the nucleolus-cytoplasm shuttling [23], the GAR domain could be involved in it through the methylation of arginins, as it was demonstrated for Np13p and Hrp1p proteins of *Saccharomyces cerevisiae* [24]. Furthermore, Ginisty et al. [25] suggest that the methylation of this domain could regulate nucleolin binding to nucleic acids, and also could take a part in protein-protein interactions. The GAR domain could also be involved in the nucleolar localization of nucleolin; in fact, it was demonstrated as necessary but not sufficient for nucleolar localization [26], perhaps through the known ability of this domain to interact with other nucleolar factors [27, 28]. Actually, it is known that nucleolin sequence contains indeed the bipartite nuclear localization sequence, but, since similar sequences do not appear to exist for the nucleolus, the identification of the true factor responsible for the nucleolar localization remains speculative [29].

Other functions described for nucleolin are the modulation of chromatin condensation, through its interaction with H1 histone [13, 14] and a nucleic acid helicase activity which is modulated by phosphorylation [30]. In particular, it was demonstrated that the human DNA helicase IV was identical to nucleolin [30], but shortly after, evidence was presented that this helicase activity may function either for DNA, or for RNA, or even for heteroduplexes that may form between these two [31]. This is a rare feature for helicases [32]. Moreover, a pea homologue of human DNA helicase I (PD65) was shown to present many similarities in localization and function with nucleolin [33]. In fact, it was localized *in situ* in the sites of rDNA transcription, it was phosphorylated by cdc2 kinase and CK2, and it showed DNA- and RNA-helicase activity. The molecular mass of this helicase was 65 kDa, which coincides with the molecular mass previously reported for pea nucleolin [6]. Everything indicates that PD65 and nucleolin are the same protein, the same case as occurred with human helicase IV. Interestingly, an onion nucleolin-like protein was described and called NopA64, showing a molecular mass of 64 kDa [5].

As above indicated, nucleolin multifunctionality is based on its modular structure, but this organization is also indirectly responsible for the ability of nucleolin to undergo posttranslational modifications, such as phosphorylation, methylation and proteolysis, which actually give the final account of some key functions.

Nucleolin participation in the control of rRNA gene transcription at different levels is closely linked to its phosphorylation by cdc2 kinase and CK2. In fact, the aminoacid sequence of nucleolin, in animals as well as in plants, contains sequences corresponding to potential sites of phosphorylation by these enzymes [4, 10, 34]. During interphase CK2 phosphorylates nucleolin in serine residues and this fact influences the rate of rDNA transcription; during mitosis, cdc2 kinase phosphorylates the protein in tyrosin residues, thus modulating ribosomal chromatin condensation in conjunction with H1 histone. In general, phosphorylation by cdc2 kinase and

CK2 are processes related to the cell cycle regulation, so that the two kinases are actually the connecting link between nucleolin, cell cycle and ribosome biogenesis.

The link between cell proliferation and nucleolin phosphorylation has been investigated in our group. We showed in bidimensional Western blots that the range of isoelectric point of the isoforms of NopA100 (the onion nucleolin homologue) in meristematic highly proliferating cells is markedly larger than that shown in differentiated nonproliferating cells (4.1 – 6.6 versus 4.8 – 6.1). Moreover, the number of isoforms recognized by anti-NopA100 antibody is dramatically reduced from 26 in meristematic cells to only 7 in differentiated non proliferating cells. A dephosphorylation assay on the meristematic cell population evidenced that the differential amount of phosphate groups was the cause of the wide range of isoelectric point shown by this cellular type [35].

Another mechanism of modulation of nucleolin activity is proteolysis. In proliferating cell populations, in which nucleolin is the major nucleolar protein, using anti-nucleolin antibodies on Western blots of nuclear or nucleolar protein fractions, a series of bands, lower in molecular mass and weaker in density, is detected together with the main band corresponding to "true" nucleolin. These additional bands correspond to a "family" of proteins, immunologically related, coming from nucleolin proteolysis [36]. The mechanism of proteolysis, mediated by an endoprotease, could be based in the existence of repeated motifs which could serve as cleavage sites. Nucleolin proteolysis is in direct relationship with its activity, in such a way that the protein could "mature" as a result of its interaction with pre-rRNA. A relationship has been observed between nucleolar activity, nucleolin function and proteolytic degradation of the protein [37, 38, 39].

Moreover, nucleolin proteolysis is closely linked to phosphorylation. Combination of these two modifications is essential for its activity. Nucleolin phosphorylation by CK2 during interphase is required for cleavage between the N-terminal and central domains, and this cleavage is necessary for release of the transcription complex, while the central and C-terminal domains remain bound to pre-rRNA and participate in further steps of its processing [40, 41]. It has been proposed that the intact non-phosphorylated nucleolin could bind rDNA acting as a transcription repressor [42, 43].

The different functions of nucleolin could be the result of its assembly with other factors in order to form complexes acting in a co-ordinated manner. Nucleolin would take part in a ribonucleoprotein (RNP) complex directed towards the organization of pre-rRNA structure and its processing, acting as a chaperon molecule [21, 44]. The first evidence of this is the presence of nucleolin in the nucleolus on dependence of the presence of pre-rRNA, while it may reside in the nucleoplasm in absence of RNA [45].

Immunoprecipitation studies in human cells for the isolation of the RNP complex showed that nucleolin was associated with nonribosomal proteins B23 and fibrillarin and the ribosomal protein S6 together with a group of unidentified, presumably ribosomal proteins [46]. Similar results were obtained by a different group [47], but the number of detected proteins increased in 60 additional ones, 40 of them ribosomal. Nucleolin proteolytic fragments were detected in these studies. Proteins of the RNP complex co-immunoprecipitating with nucleolin form an interesting subgroup within nucleolar proteins, but the absence from this subgroup of some of the major nucleolar phosphoproteins, such as Nopp140, was strikingly observed. In both studies, the need of an integral pre-rRNA was evidenced for the stability of the complex, suggesting that it is a true ribonucleoprotein complex, and not merely an association of proteins.

FIBRILLARIN

The nucleolar protein fibrillarin was firstly detected, using a human autoantiserum, in the nucleolar dense fibrillar component (DFC), and this result was the reason for its name [48]. It is a protein highly conserved in sequence, structure and function in different eukaryotic organisms

[49]. Its apparent molecular mass is 34-37 kDa and, like nucleolin, it is a modular protein [50], with an RNA binding domain in its central part formed by two highly conserved sequences, RNP1 and RNP2, which are involved in different steps of pre-rRNA processing, including its methylation, and preribosome assembly [51]. It contains a second domain, the glycine-arginine-rich (GAR) motif, which is also present in nucleolin (see above), and which could be responsible of the nucleolar localization of the protein [52].

Fibrillarin directly interacts with snoRNAs of the "box C/D" group (U3, U8 and U13 snoRNAs) [53] in order to form an snoRNP complex for pre-rRNA processing [54]. Functions attributed to this snoRNP in the first pre-rRNA processing step (cleavage of 5' ETS) constitute a basic mechanism in the whole process, guided by pre-rRNA methylation, which depends on this group of snoRNAs, together with fibrillarin [55].

Plant fibrillarin was identified by cross-reaction with human autoimmune sera, and its ultrastructural intranucleolar distribution during the cell cycle, its presence in the nuclear matrix and the variations of its levels depending on the cell differentiation state and the cell cycle progression were shown [56, 57]. These levels are higher in proliferating than in nonproliferating cells, and G2 cell nucleoli contain more than twice as many fibrillarin as G1 ones. This is probably associated with changes in the nucleolar transcriptional activity which occur through the cell cycle [57].

Regarding its intranucleolar distribution, as above mentioned it was firstly associated with DFC. However, a more detailed study by immunolocalization in actively proliferating plant cells showed that the protein was not evenly distributed in the DFC, but it was concentrated in the transition zones of DFC with fibrillar centers (FCs), being progressively decreasing in the distal parts of the DFC [57].

RNA POLYMERASE I COMPLEX

The enzymatic complex RNA polymerase I (RNA pol I) specifically transcribes rRNA genes in the eukaryotic nucleolus, with the exception of 5 S rRNA, which is transcribed by RNA pol III, outside of the nucleolus. In different organisms, and particularly in plants, RNA pol I has been purified in the form of holoenzyme, made up by more than 30 polypeptides, which, as a whole, may reach up to 2 MDa in molecular mass [58]. It was suggested that RNA pol I can pre-associate with transcription factors in the absence of DNA, to form the holoenzyme, and this association could be sufficient to activate the promoter recognition and the initiation of transcription [59].

Using antibodies against the largest subunits of RNA pol I in mammalian cells the enzyme was localized in nucleolar FCs and in the chromosomal secondary constriction, which corresponds to the nucleolar organizing region (NOR), and contains the rRNA genes [60, 61]. However, it was repeatedly shown that the presence of the enzyme does not necessarily means that the transcriptional process is being currently taking place in the sites in which it was detected. Immunolocalization of rDNA-bound RNA pol I would reveal the presence of ribosomal chromatin either in transcription, or ready for transcription [62, 63].

Among specific transcription factors for RNA pol I which regulate its activity, the best known is upstream binding factor (UBF). This factor was studied with great detail in different vertebrates [64, 65] and it is thought that this is a highly conserved protein. However, it has recently been proposed that UBF is not present in plants, but only in vertebrates [59]. Nevertheless, evidences for the presence of an UBF homologue in plants were reported more than a decade ago [66] in a study using a human autoantiserum which involved its immunolocalization *in situ* and its detection by Western blotting in HeLa, chicken, *Xenopus*, onion and protozoa. More recently, onion UBF was detected in the nucleolar DFC [67, 68].

There is a high disparity regarding the molecular mass of UBF in the different organisms in which it has been reported [66, 69, 70], even though the isoelectric point is coincident around 7.0. Actually, the necessity of sequencing the plant UBF is becoming evident in order to definitely clarify the presence of this factor in plants and its putative homology with vertebrates.

PROTEIN B23

This is another phosphoprotein which is abundant in actively proliferating cell nucleoli. It is also known as numatrin, nucleophosmin and NO38. It was described in different animal species, with a molecular mass of 35-40 kDa [71, 72, 73, 74]. However, it has never been described in plants.

This protein was firstly localized in the nucleolar granular component (GC) [75], though, in further studies, its localization in the DFC was also reported [76]. Similarly as nucleolin and fibrillarin, protein B23 is associated with multiple functions in ribosome biogenesis, in this case mainly related to preribosome assembly and other later steps of the process [77, 78, 79]. Other functions postulated for this protein are as nucleolus-cytoplasmic shuttle [23, 27] and transcriptional regulator by inducing structural changes in chromatin [80]. Most of these functions are regulated by phosphorylation by cyclin-dependent protein kinases [34, 81, 82]. Moreover, a δ isoform of type I protein phosphatase has been shown to take a part in dephosphorylation of protein B23 [83]. This protein has been associated with nucleolin and fibrillarin in the formation of nucleolar RNP transitory complexes [27, 46].

Together with nucleolin, B23 is one of the main proteins responsible for Ag-NOR staining. For this reason, and for its dependence on cell proliferation, it has been widely used in diagnostic methods for tumor detection.

Nopp140

This nucleolar phosphoprotein was described as a shuttle for fibrillarin and NAP57 between the nucleolus and Cajal bodies [84], and also, with a more general range of transported products, between the nucleolus and the cytoplasm [85]. Another well characterized function of Nopp140 is in the assembly and transport of snoRNPs. In fact, it is one of the few proteins capable of binding the two groups of snoRNPs, namely C/D box and H/ACA [86]. By immunoprecipitation it was shown that Nopp140 associates with NAP57, CK2 and two integral components of the box C/D snoRNP complex, fibrillarin and NAP65, as well as components of the H/ACA snoRNP, such as GAR1 [86]. Moreover, Nopp140-snoRNP interaction appears to be conserved in evolution. An homologous protein of Nopp140 described in yeast, called Srp40p [87] interacts, at least, with one class of snoRNPs. Another functions proposed for Nopp140 are in the maintenance of nucleolar structure and its assembly, by means of its interaction with RNA pol I [88].

The protein Nopp140, similarly as B23, has been widely studied in mammalian cells and their dependence on cell cycle and proliferation has been evidenced. However, in spite of the wide knowledge of these two proteins in animal and yeast, and the well supported supposition that they are evolutionarily conserved proteins, no information exists on their putative plant homologues. Therefore, it should be encouraged the necessity of doing the work to fill this gap, not only for getting additional data to complete the plant nucleolar protein catalogue, but also since the information on fundamental cellular processes, such as the nucleolar organization the nucleolus-cytoplasm transport, the protein-protein interactions, the composition of snoRNPs, the identity of Cajal bodies and many others, could be substantially improved.

Ag-NOR PROTEINS

As it has been repeatedly mentioned in preceding sections, the levels of expression of some nucleolar proteins are dependent on the current cellular proliferating activity, being highly stimulated when the cell is actively dividing and cycling. This feature is advantageous for utilizing these proteins as markers of the cell proliferation status. The simplest and more efficient method for the practical application of this feature consists of the use of the cytochemical method of silver staining of the nucleolar organizing region (Ag-NOR staining), a procedure used to detect the nucleolar organizer in chromosome preparations [89]. It is based on the enhanced affinity of certain nucleolar proteins for the silver ions. After an intense investigation on the matter by different laboratories, still today it does not appear to be clear the chemical basis of the Ag-NOR staining, although, certainly, Ag-NOR proteins are among the most phosphorylated proteins of the cell [90, 91, 92, 93, 94]. Actually, the enhanced affinity of the nucleolus for silver staining is a feature known more than a century ago, already reported by Cajal [95] and later used in classic investigations on the nucleolar structural organization [96].

In any case, it is well established that the intensity of Ag-NOR staining, densitometrically assessed, varies in dependence of the cellular proliferating activity [97], and this feature has been widely utilized in clinical applications dealing with diagnosis and prognosis of malignant tumors [98] and, recently, with apoptosis [99].

In the last years, the running of the Ag-NOR staining on proteins electrophoretically separated and transferred to membranes has allowed the identification of the proteins which show affinity for silver, such as nucleolin, B23 [93, 100] and a subunit of RNA polymerase I [101, 102]; these experiments have also detected a series of minor bands which could correspond to maturation products of nucleolin, as well as other still unidentified proteins [103, 104]. It was determined that the staining intensity is directly related to the amount of protein [105]. In proliferating cells, more than 60% of the total staining is due to nucleolin and B23, whereas in nonproliferating cells nucleolin is practically undetected, whereas B23 is still evident, although in amounts lower than those exhibited in the G1 period of proliferating cells. The staining technique clearly demonstrated that the maximum expression of nucleolin and B23 occurred in G2. Other than these two major proteins, a 140 kDa band also showed a clear dependence on the cell cycle periods [106].

FUTURE PROSPECTS

In the last years, the resolution of bidimensional gels and their reproducibility have very much improved. In addition, protein and gene databases have greatly developed. These facts, together with the possibility of identifying proteins by mass spectrometry (MS) methods, has offered the possibility of large scale protein studies and has open new roads for fundamental and applied research in Plant Biology. For instance, new or improved proteomic techniques are allowing studies on the formation of protein complexes, their presence or absence in certain protein fractions, organelles or tissues, in distinct phases of cellular activity, or under different environmental conditions, such as stresses, hormone actions or infections.

Nevertheless, the availability of protein or gene sequences is much lower in plants than in mammals or yeast, and their achievement has represented a challenge for Plant Biology researchers. The progress in recent years and the immediate expectations offered by Plant Proteomics are immense [107, 108, 109, 110, 111, 112].

At the present time, MS sequencing is accompanied in many cases by amino terminal sequencing by Edman reaction [113, 114]. Only in very few cases the MS approach has been used exclusively, and in these cases, *Arabidopsis* was used as biological model, taking advance of the existence of full gene databases [115, 116].

For proteomic studies in organisms in which the genome is not sequenced there are two basic strategies: one of them is the identification of proteins after obtaining tag sequences by spectrometry (ESI-MS/MS, or MALDI-TOF/PSD). Then, generated ESTs would be compared with the catalog of known genes, or by means of similarities. Using this strategy, Mathesius et al. [117] increased up to 45% the identification of proteins of the alfalfa root from an initial 25% which had been identified using protein databases. They proposed the simultaneous utilization of multiple databases (proteins, genes and ESTs), although this strategy requires that the genome is at least partially known.

A second strategy is the comparison of aminoacid sequences generated from MS/MS, MALDI-TOF/PSD or Edman with sequences available in databases, and further identification by homology with previously existing sequences. However, when the biological models have non-sequenced genomes, the ability for identifying proteins depends on the contents of databases, and the alternative of identifying by interspecific cross-similitude is limited by the relative distance between organisms; if this distance is long, the probability of identifying proteins decreases [118].

A catalogue of nucleolar proteins has been already obtained, for human cells [119, 120], with an approximate number of 350 proteins, although only less than 100 are attributed a known function. Interestingly, this set of proteins contains a sizeable portion whose function is not related to the "typical" nucleolar function, namely ribosome biogenesis. As indicated, the performance of a similar analysis in plants, with the possible exception of *Arabidopsis*, is much more difficult. Therefore, the alternative is a proteomic analysis of the nucleolus using functional criteria for selecting sets of proteins to identify and characterize. One of the more interesting strategies for this selection is immunoprecipitation [46, 47], by means of which proteins belonging to a complex associated to a given protein, which co-operate in a certain function, can be isolated.

In our case, with the onion cell nucleolus, we have carried out the study of nucleolar proteins associated with cell proliferation by selecting a protein fraction using solubility criteria with functional significance [121, 122] and then comparing this fraction in meristematic (proliferating) and non-meristematic (differentiated, non-proliferating) root cells. Special attention was given to the identification and characterization of the onion nucleolin homologue, which was called NopA100, and to study its posttranslational modifications, such as phosphorylation and proteolysis, which modulate its function throughout the cell cycle [35].

The identification of proteins in this "functional subproteome" is obviously limited by the existence of known homologues of proteins to identify in species with sequenced genomes. For this reason, the use of antibodies, or other techniques to select subsets of proteins, such as the "Ag-NOR" staining, could be highly useful tools in the selection of spots from the bidimensional gel, on which mass spectrometry could be further applied. Therefore, in species in which problems could be present due to the absence of gene sequences, we propose an intermediate step in the protocol of proteomic analysis, which is the identification of candidate spots by direct or indirect methods with functional significance, prior to the application of mass spectrometry techniques (Fig. 2).

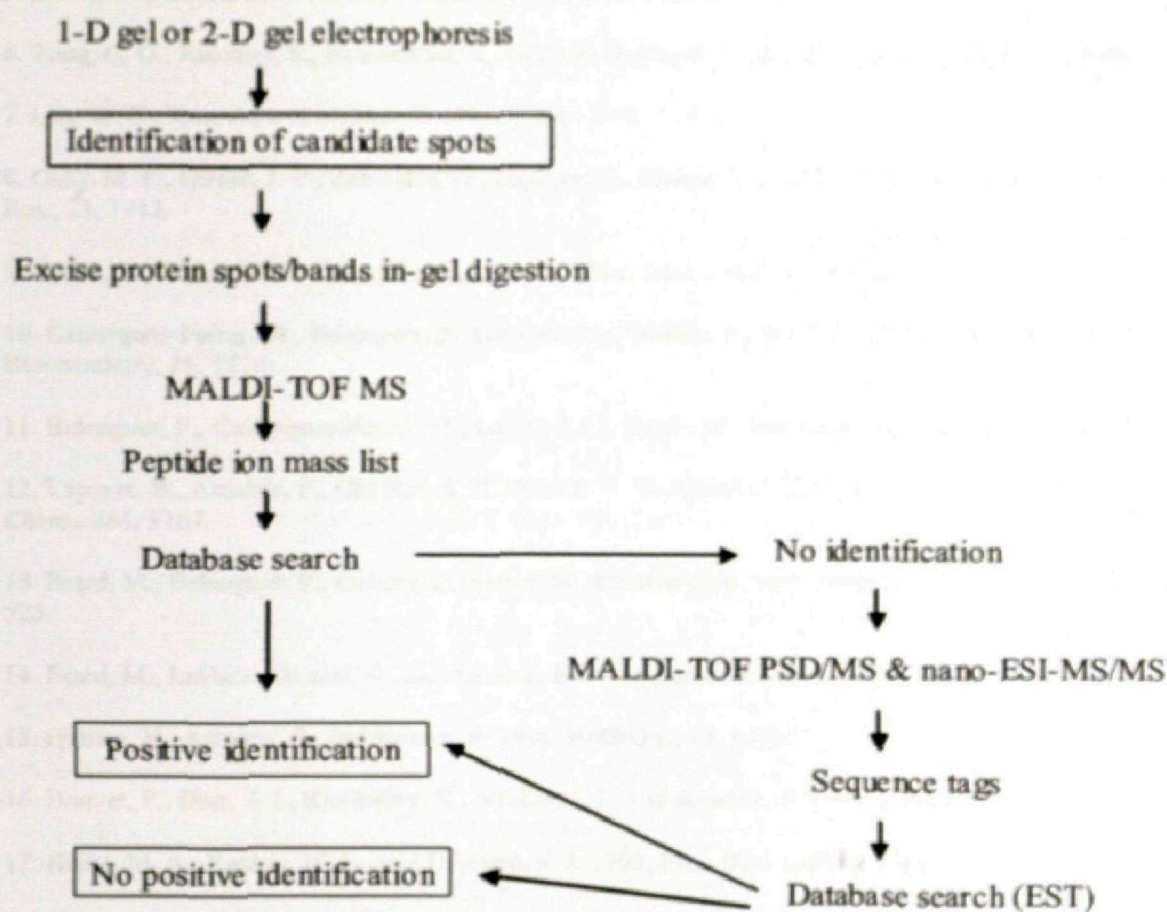


Figure 2.- Protocol for proteomic analysis, introducing the previous identification of candidate spots by functionally significant direct or indirect methods. Mass spectrometry analysis should then be focused on these selected spots (Adapted from [109]).

ACKNOWLEDGEMENTS

Work performed in the authors' laboratory was supported by a grant of the Spanish National Plan for Research, Development and Innovation, Grant No. ESP1999-0379-C02-02 and No. ESP2001-4522-PE.

REFERENCES

1. Lapeyre, B., Bourbon, H. M., and Amalric, F. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1472.
2. Martín, M., García-Fernández, L. F., Moreno Díaz de la Espina, S., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., and Medina, F. J. 1992, *Exp. Cell Res.*, 199, 74.
3. Didier, D. K. and Klee, H. J. 1992, *Plant Mol. Biol.*, 18, 977.
4. Bögre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D. T. C., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E., and Hirt, H. 1996, *Plant Cell*, 8, 417.

5. De Cárcer, G., Cerdido, A., and Medina, F. J. 1997, *Planta*, 201, 487.
6. Tong, C. G., Reichler, S., Blumenthal, S., Balk, J., Hsieh, H. L., and Roux, S. J. 1997, *Plant Physiol.*, 114, 643.
7. Lee, W. C., Xue, Z., and Mélése, T. 1991, *J. Cell Biol.*, 113, 1.
8. Gulli, M. P., Girard, J.-P., Zabetakis, D., Lapeyre, B., Melese, T., and Caizergues-Ferrer, M. 1995, *Nucl. Acids Res.*, 23, 1912.
9. Orrick, L., Olson, M. O. J., and Busch, H. 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1316.
10. Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M. O., and Olson, M. O. J. 1987, *Biochemistry*, 26, 7876.
11. Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Labbé, J. C., Dorée, M., and Amalric, F. 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10, 3607.
12. Lapeyre, B., Amalric, F., Ghaffari, S. H., Rao, S. V. V., Dumbar, T. S., and Olson, M. O. J. 1986, *J. Biol. Chem.*, 261, 9167.
13. Erard, M., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A., and Amalric, F. 1988, *Eur. J. Biochem.*, 175, 525.
14. Erard, M., Lakhdar-Ghazal, F., and Amalric, F. 1990, *Eur. J. Biochem.*, 191, 19.
15. Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. 1998, *EMBO J.*, 17, 1476.
16. Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J., and Amalric, F. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 19025.
17. Heine, M. A., Rankin, M. L., and DiMario, P. J. 1993, *Mol. Biol. Cell*, 4, 1189.
18. Tuteja, R. and Tuteja, N. 1998, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33, 407.
19. Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A., and Mann, M. 2002, *Genome Res.*, 12, 1231.
20. Sipos, K. and Olson, M. O. J. 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177, 673.
21. Allain, F. H., Bouvet, P., Dieckmann, T., and Feigon, J. 2000, *EMBO J.*, 19, 6870.
22. Bouvet, P., Allain, F. H., Finger, L. D., Dieckmann, T., and Feigon, F. 2001, *J. Mol. Biol.*, 309, 763.
23. Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., and Nigg, E. A. 1989, *Cell*, 56, 379.
24. Shen, E. C., Henry, M. F., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silve, P. A., and Lee, M.-S. 1998, *Genes Dev.*, 12, 679.
25. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. 1999, *J. Cell Sci.*, 112, 761.
26. Pellar, G. J. and DiMario, P. 2003, *Chromosoma*, 111, 461.
27. Li, Y. P., Busch, R. K., Valdez, B. C., and Busch, H. 1996, *Eur. J. Biochem.*, 237, 153.
28. Schwab, M. S. and Dreyer, C. 1997, *Eur. J. Cell Biol.*, 73, 287.
29. Créancier, L., Prats, H., Zanibellato, C., Amalric, F., and Bugler, B. 1993, *Mol. Biol. Cell*, 4, 1239.
30. Tuteja, N., Huang, N. W., Skopac, D., Tuteja, R., Hrvatic, S., Zhang, J., Pongor, S., Joseph, G., Faucher, C., Amalric, F., and Falaschi, A. 1995, *Gene*, 160, 143.
31. Tuteja, N. and Tuteja, R. 1996, *Nat. Genet.*, 13, 11.

32. Matson, S. W., Bean, D., and George, K. A. 1994, *BioEssays*, 16, 13.
33. Tuteja, N., Beven, A., Shaw, P. J., and Tuteja, R. 2001, *Plant J.*, 25, 9.
34. Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C., and Nigg, E. A. 1990, *Cell*, 60, 791.
35. González-Camacho, F. and Medina, F. J. 2003, *Proteomics*. In Press.
36. Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H. M., and Amalric, F. 1982, *Eur. J. Biochem.*, 128, 475.
37. Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B., and Amalric, F. 1984, *Nucl. Acids Res.*, 12, 3025.
38. Bourbon, H. M., Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., and Amalric, F. 1983, *Mol. Biol. Rep.*, 9, 39.
39. Chen, C. M., Chiang, S. Y., and Yeh, N. H. 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 7754.
40. Bourbon, H. M., Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., and Amalric, F. 1983, *FEBS Lett.*, 155, 218.
41. Warrenner, P. and Petryshyn, R. 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 716.
42. Fang, S. H. and Yeh, N. H. 1993, *Exp. Cell Res.*, 208, 48.
43. Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., and Bouvet, P. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 10209.
44. Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., and Bouvet, P. 2003, *Chromosoma*, 111, 399.
45. Markus, S. S., Ulrike, G., and Christine, D. 2003, *Exp. Cell Res.*, 239, 226.
46. Piñol-Roma, S. 1999, *Mol. Biol. Cell*, 10, 77.
47. Yanagida, M., Shimamoto, A., Nishikawa, K., Furuichi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. 2001, *Proteomics*, 1, 1390.
48. Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H., and Busch, H. 1985, *Biol. Cell*, 54, 123.
49. Guiltinan, M. J., Schelling, M. E., Ehteshami, N. Z., Thomas, J. C., and Christensen, M. E. 1988, *Eur. J. Cell Biol.*, 46, 547.
50. Aris, J. P. and Blobel, G. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 931.
51. Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E. C. 1993, *Cell*, 72, 443.
52. Pih, K. T., Yi, M. J., Liang, Y. S., Shin, B. J., Cho, M. J., Hwang, I., and Son, D. 2000, *Plant Physiol.*, 123, 51.
53. Fatica, A., Galardi, S., Altieri, F., and Bozzoni, I. 2000, *RNA Publ. RNA Soc.*, 6, 88.
54. Baserga, S. J., Yang, X. W., and Steitz, J. A. 1991, *EMBO J.*, 10, 2645.
55. Leader, D. J., Clark, G. P., Boag, J., Watters, J. A., Simpson, C. G., Watkins, N. J., Maxwell, E. S., and Brown, J. W. S. 1998, *Eur. J. Biochem.*, 253, 154.
56. Medina, F. J., Cerdido, A., and Fernández-Gómez, M. E. 1995, *Exp. Cell Res.*, 221, 111.
57. Cerdido, A. and Medina, F. J. 1995, *Chromosoma*, 103, 625.
58. Saez-Vasquez, J. and Pikaard, C. S. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11869.
59. Saez-Vasquez, J., Meissner, M., and Pikaard, C. S. 2001, *Plant Mol. Biol.*, 47, 449.

60. Scheer, U. and Rose, K. M. 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1431.
61. Gilbert, N., Lucas, L., Klein, C., Menager, M., Bonnet, N., and Ploton, D. 1995, *J. Cell Sci.*, 108, 115.
62. Weisenberger, D. and Scheer, U. 1995, *J. Cell Biol.*, 129, 561.
63. Hozák, P. 1995, *Exp. Cell Res.*, 216, 285.
64. Reeder, R. H. 1990, *Trends Genet.*, 6, 390.
65. Schnapp, A. and Grummt, I. 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 24588.
66. Rodrigo, R. M., Rendón, M. C., Torreblanca, J., García-Herdugo, G., and Moreno, F. J. 1992, *J. Cell Sci.*, 103, 1053.
67. De Cárcer, G. and Medina, F. J. 1999, *J. Struct. Biol.*, 128, 139.
68. Tao, W., Xu, W., Valdivia, M. M., He, M., and Hao, S. 2001, *Cell Biol. Int.*, 11, 1167.
69. Pikaard, C. S., McStay, B., Schultz, M. C., Bell, S. P., and Reeder, R. H. 1989, *Genes Dev.*, 3, 1779.
70. Jantzen, H. M., Admon, A., Bell, S. P., and Tjian, R. 1990, *Nature*, 344, 830.
71. Chang, J. H., Dumbar, T. S., and Olson, M. O. J. 1988, *J. Biol. Chem.*, 263, 12824.
72. Maridor, G., Krek, W., and Nigg, E. A. 1990, *Biochim. Biophys. Acta*, 1049, 126.
73. Peculis, B. A. and Gall, J. G. 1992, *J. Cell Biol.*, 116, 1.
74. Umekawa, H., Chang, J. H., Correia, J. J., Wang, D., Wingfield, P. T., and Olson, M. O. J. 1994, *Cell. Mol. Biol. Res.*, 39, 635.
75. Spector, D. L., Ochs, R. L., and Busch, H. 1984, *Chromosoma*, 90, 139.
76. Biggiogera, M., Burki, K., Kaufmann, S. H., Shaper, J. H., Gas, N., Amalric, F., and Fakan, S. 1990, *Development*, 110, 1263.
77. Dumbar, T. S., Gentry, G. A., and Olson, M. O. J. 1989, *Biochemistry*, 28, 9495.
78. Wang, D., Umekawa, H., and Olson, M. O. J. 1993, *Cell. Mol. Biol. Res.*, 39, 33.
79. Szebeni, A. and Olson, M. O. J. 1999, *Protein Sci.*, 8, 905.
80. Okuwaki, M., Iwamatsu, A., Tsujimoto, M., and Nagata, K. 2001, *J. Mol. Biol.*, 311, 41.
81. Feuerstein, N. 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 16200.
82. Tawfic, S., Olson, M. O. J., and Ahmed, K. 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 21009.
83. Kotani, H., Ito, M., Hamaguchi, T., Ichikawa, K., Nakano, T., Shima, H., Nagao, M., Ohta, N., Furuichi, Y., Takahashi, T., and Umekawa, H. 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 292.
84. Isaac, C., Yang, Y. F., and Meier, U. T. 1998, *J. Cell Biol.*, 142, 319.
85. Meier, U. T. and Blobel, G. 1992, *Cell*, 70, 127.
86. Yang, Y., Isaac, C., Wang, C., Dragon, F., Pogacic, V., and Meier, U. T. 2000, *Mol. Biol. Cell*, 11, 567.
87. Meier, U. T. 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 19376.

88. Chen, H., Pai, C. Y., Huang, J., and Yeh, N. H. 1999, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 8536.
89. Goodpasture, C. and Bloom, S. E. 1975, *Chromosoma*, 53, 37.
90. Medina, F. J., Solanilla, E. L., Sánchez-Pina, M. A., Fernández-Gómez, M. E., and Risueño, M. C. 1986, *Chromosoma*, 94, 259.
91. Medina, F. J., Risueño, M. C., Sánchez-Pina, M. A., and Fernández-Gómez, M. E. 1983, *Chromosoma*, 88, 149.
92. Medina, F. J., Cerdido, A., and Marco, R. 1995, *Histochemistry*, 103, 403.
93. Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F., and Hernandez-Verdun, D. 1992, *Exp. Cell Res.*, 203, 259.
94. Valdez, B. C., Henning, D., Le, T. V., and Busch, H. 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 485.
95. Cajal, S. R. 1903, *Trab. Lab. Invest. Biol.*, 2, 129.
96. Estable, C. and Sotelo, J. R. 1951, *Publicaciones del Instituto de Investigaciones Científicas*.
97. Leek, R. D., Alison, M. R., and Sarraf, C. E. 1991, *J. Pathol.*, 165, 43.
98. Derenzini, M. and Trerè, D. 1991, *Virchows Arch. [B]*, 61, 1.
99. Kito, S., Shimizu, K., Okamura, H., Yoshida, K., Morimoto, H., Fujita, M., Morimoto, Y., Ohba, T., and Hancji, T. 2003, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 950.
100. Hozák, P., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. 1992, *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 1089.
101. Masson, C., Andre, C., Arnoult, J., Geraud, G., and Hernandez-Verdun, D. 1990, *J. Cell Sci.*, 95, 371.
102. Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. 2000, *Micron*, 31, 121.
103. Derenzini, M., Sirri, V., Pession, A., Trerè, D., Roussel, P., Ochs, R. L., and Hernandez-Verdun, D. 1995, *Exp. Cell Res.*, 219, 276.
104. Sirri, V., Roussel, P., Trerè, D., Derenzini, M., and Hernandez-Verdun, D. 1995, *J. Histochem. Cytochem.*, 43, 887.
105. Roussel, P., Sirri, V., and Hernandez-Verdun, D. 1994, *J. Histochem. Cytochem.*, 42, 1513.
106. Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M. C., and Hernandez-Verdun, D. 1997, *Cytometry*, 28, 147.
107. Thielllement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., De Vienne, D., and Zivy, M. 1999, *Electrophoresis*, 20, 2013.
108. Thielllement, H., Zivy, M., and Plomion, C. 2002, *Journal of Chromatography B*, 782, 137.
109. van Wijk, K. J. 2001, *Plant Physiol.*, 126, 501.
110. Kersten, B., Bürkle, L., Kuhn, E. J., Giavalisco, P., Konthur, Z., Lueking, A., Walter, G., Eickhoff, H., and Schneider, U. 2002, *Plant Mol. Biol.*, 48, 133.
111. Rossignol, M. 2001, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 131.
112. Xing, T., Ouellet, T., and Miki, B. L. 2002, *Trends Plant Sci.*, 7, 224.
113. Prime, T. A., Sherrier, D. J., Mahon, P., Packman, L. C., and Dupree, P. 2000, *Electrophoresis*, 21, 3488.
114. Shen, S., Jing, Y., and Kuang, T. 2003, *Proteomics*, 3, 527.

115. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., and Job, D. 2001, *Plant Physiol.*, 126, 835.
116. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., and Job, D. 2002, *Plant Physiol.*, 129, 823.
117. Mathesius, U., Keijzes, G., Natera, S. H. A., Weinman, J. J., Djordjevic, M. A., and Rolfe, B. G. 2001, *Proteomics*, 1, 1424.
118. Liska, A. J. and Shevchenko, A. 2003, *Proteomics*, 3, 19.
119. Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H. B., Mann, M., and Lamond, A. I. 2002, *Curr. Biol.*, 12, 1.
120. Scherl, A., Couté, Y., Déon, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sánchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D., and Diaz, J. J. 2002, *Mol. Biol. Cell*, 13, 4100.
121. Busch, H., Ballal, N. R., Rao, M. R. S., Choi, Y. C., and Rothblum, L. I. 1978, in *The Cell Nucleus*, vol. 5, *Chromatin*, part B., H. Busch (Ed.), Academic Press, New York, San Francisco, London, 416.
122. Rothblum, L. I., Mamrack, P. M., Kunkle, H. M., Olson, M. O. J., and Busch, H. 1977, *Biochemistry*, 16, 4716.

**IN SITU LOCALIZATION OF THE ONION NUCLEOLAR PROTEIN
NopA64 IS DEPENDENT ON CELL PROLIFERATION MECHANISMS
AND CELL CYCLE PHASES**

FRANCISCO JAVIER MEDINA, FERNANDO GONZÁLEZ-CAMACHO,
ANTONIO CERDIDO and GUILLERMO DE CÁRCER
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Velázquez 144, E-28006 Madrid, Spain
Email: fjmedina@cib.csic.es

Introduction

There is abundant experimental evidence that the process of ribosome biogenesis, which is morphologically expressed in the cell nucleus as a prominent organelle, the nucleolus, is highly dependent on factors regulating cell proliferation and cell cycle progression. Thus, factors stimulating cell growth and division produce an increase of the rate of ribosome biogenesis; moreover, this rate is regulated during the cell cycle, in which it increases from G1 to G2 and is stopped during mitosis, accompanied by the disassembly of the nucleolus (Medina *et al.*, 2000).

It is well known that this evolution of the nucleolus during cell cycle periods is associated to the changes detected in the main nucleolar proteins. These proteins, acting as targets of factors controlling cell proliferation and cell cycle progression, and, at the same time, as regulators of the rate of pre-rRNA transcription and/or processing at different levels, could be the bridge connecting cell cycle and proliferation events and regulation of ribosome biogenesis (Olson, 1991). Among nucleolar proteins, nucleolin is a multifunctional protein, known to play roles in determining the structure of the chromatin containing the ribosomal RNA (rRNA) genes, in the activation of rRNA gene transcription, and in different steps of pre-rRNA processing (Tuteja and Tuteja, 1998; Ginisty *et al.*, 1999). At least part of these functions are determined by the level of phosphorylation of nucleolin by two kinases, namely cdc2 kinase and casein kinase II, known to play crucial roles in the regulation and co-ordination of cellular events involved in cell cycle and proliferation. As a consequence, nucleolin is one of the most abundant proteins in proliferating cells, whereas its expression is greatly reduced in quiescent cells. During the G1 period, nucleolin expression is low, and progressively increases at high rate until the S period; later, in G2, the expression continues increasing, but at a lower rate, in such a way that the maximum level is reached just before mitosis. During cell division, nucleolin, together with other nucleolar proteins (fibrillarin, B23) and pre-rRNA, is found in the nucleolar materials that associate to the

chromosome periphery to be carried to the daughter cells, as well as in prenucleolar bodies.

We have recently characterized in our laboratory a nucleolar protein of plant cells, that we have called NopA64, showing interesting biochemical and immunological analogies with the mammalian nucleolin (De Cárcer *et al.*, 1997). In particular, we have demonstrated its enrichment in proliferating cells with respect to differentiated cells, and its phosphorylation pattern in relation to casein kinase II and cdc2 kinase. In this paper we present a study of the localization *in situ* of this protein in different conditions of cell proliferation and cell cycle progression. The dependence on these factors for the quantitative levels that the protein attains in the nucleolus, and also for its localization and distribution, make it a suitable marker to study the influence on ribosome biogenesis of mechanisms controlling the cell cycle and proliferation events in plants.

Materials and Methods

Biological materials

Meristematic and quiescent cells were taken from onion (*Allium cepa*) roots. Onion bulbs were germinated in filtered water (milli-RO water). Quiescent root meristems were dissected directly from unsoaked onion bulbs.

Immunofluorescence

Onion root meristems were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS, pH 7.5, for 2 h at room temperature (RT). The initial 5 min of the fixation were carried out in a vacuum chamber to facilitate the penetration of the formaldehyde solution inside the meristematic blocks. After fixation, free aldehyde radicals were blocked with 30 mM glycine in PBS for 30 min at RT, and by two treatments, 15 min each, with 0.5% sodium borohydride in PBS. Then, roots were dehydrated in an ethanol series and embedded in the acrylic resin Immunobed (EMS), according to the instructions of the manufacturer. Semithin sections, 2 μ m thick, mounted on round, poly-lysine- or APTES-coated coverslips, were first incubated in blocking solution (2% BSA in PBS) for 30 min, and then incubated with anti-NopA64, at a dilution of 1:100 for 1 h at RT. Coverslips were rinsed three times in PBS and then incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, diluted 1:100, for 45-60 min at RT. After several washes in PBS, cells were stained with DAPI reagent (2 μ g/ml) for 5 min. Finally preparations were mounted over microscope slides with Mowiol 40.88 (Aldrich), visualized with a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope, and recorded with a Photometrics CCD camera, model CE 200A.

In other cases, roots were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.5, plus 5 mM MgSO₄ and 10mM EGTA, for 1 h at RT. After a glycine treatment similar to

that above described, cell walls were digested for 1 h at 37°C in wall digestion solution (2 % (w/v) cellulase, 1% (w/v) pectinase, 0.5% (w/v) macerozyme and 0.4 M mannitol in PBS), and meristems were squashed over round coated coverslips. These cells can be dried and stored at -20°C. Frozen squashed cells were brought to RT, rehydrated in PBS and incubated again with wall digestion solution for 20 min at RT, and then the nuclear envelope was permeabilized with 1% (v/v) Nonidet P-40 and 0.5% (v/v) sodium deoxycholate in PBS for 10 min at RT. Incubations for immunofluorescence, mounting and observation were done as above described, but antibodies were more diluted (1:400 the first antibody and 1:200 the secondary one).

Immunogold electron microscopy

Single labeling: Ultrathin sections of onion roots fixed in 4% paraformaldehyde/0.5% glutaraldehyde and embedded in LR White were incubated successively with a blocking solution containing 2% BSA in PBST (PBS plus 0.05% Tween), with anti-NopA64 diluted 1:50, and with 10 nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG, diluted 1:100 (for details of the procedures and controls, see Cerdido and Medina, 1995).

Double-labeling: The method described by Geuze *et al.* (1981) has been followed. All steps were performed at RT. After a previous incubation in blocking solution for 30 min, ultrathin sections were incubated with anti-NopA64 diluted 1:50 in blocking solution for 1 h. Then they were incubated in 5 nm gold-conjugated protein A diluted 1:50 in blocking solution for 45 min and treated with unlabeled protein A diluted 1:50. The following incubation was with either anti-CKII (dilution 1:10) or anti-cdc2 kinase (dilution 1:25). Finally, grids were incubated with 20 nm gold-conjugated protein A diluted 1:50 in blocking solution. Incubations were separated by three washings, 10 min each, in PBST. At the end of the process, grids were rinsed in water and counterstained with 2% aqueous uranyl acetate for 8 min. Controls consisted of the substitution of antibodies by preimmune serum.

Flow Cytometry

Onion nuclei, isolated from root meristems according to our previously described procedure (De Cárcer *et al.*, 1997) were fixed in 4% paraformaldehyde in nuclei stock buffer for 30 min at 4°C, and permeabilized with 1% Nonidet P-40 in the same buffer for 10 min. After blocking with 2% BSA, they were successively incubated with the first and the second antibodies as described above for immunofluorescence experiments. Finally, nuclei were resuspended in PBS plus 0.5% Triton X-100, with 50 µg/ml propidium iodide.

An Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation) was used for measuring the intensity of the fluorescence emitted by FITC, at 525 nm, in logarithmic scale, in each one of the interphase periods (G1, S, and G2). These periods were determined

by measuring, in linear scale, at 600 nm, the fluorescence emitted by propidium iodide. In both cases, excitation was done with light emitted at 488 nm with an argon laser.

Results

In situ localization of NopA64 in proliferating cells during interphase

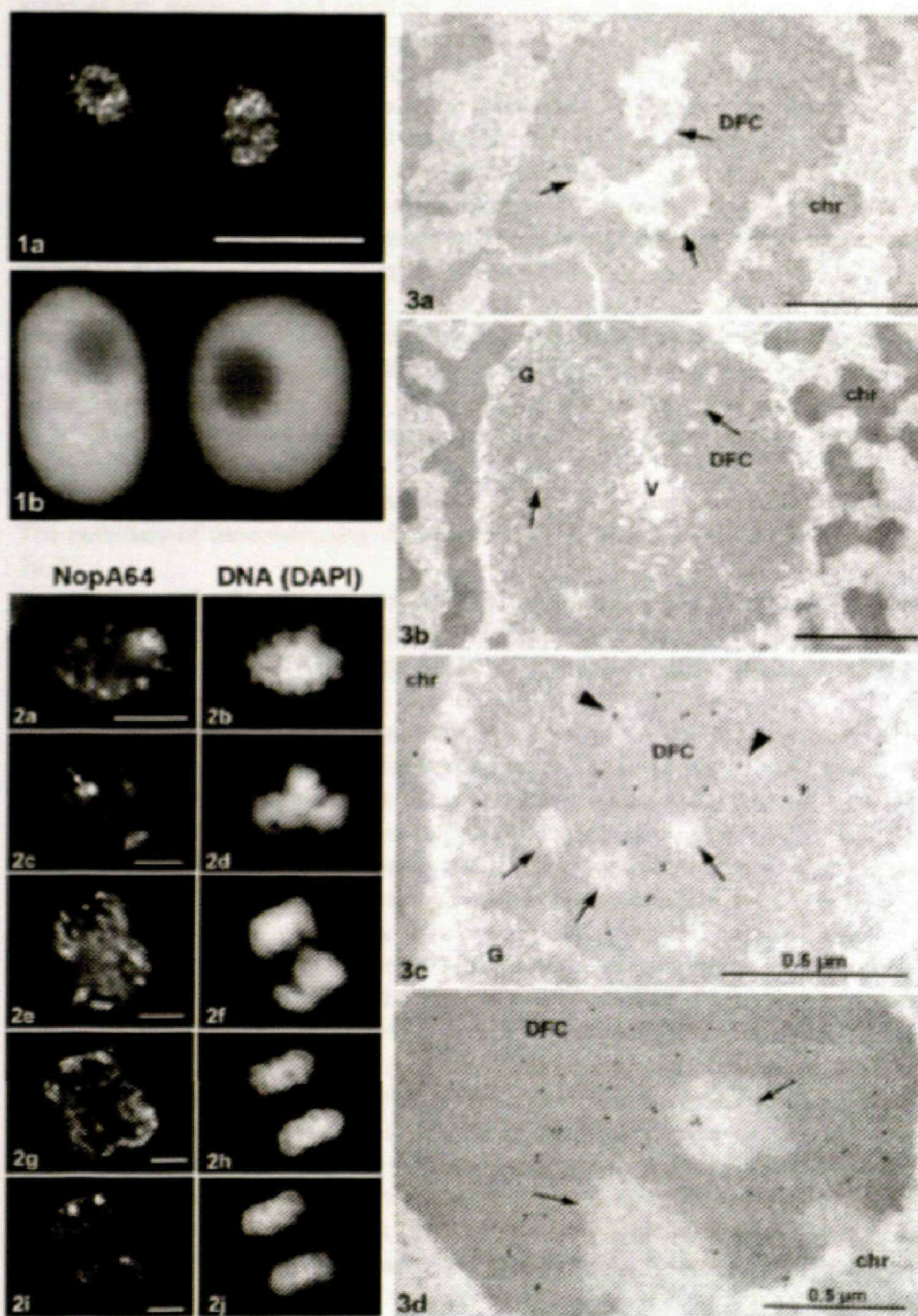
The use of 2 μ m semithin sections of Immunobed-embedded roots for immunofluorescence studies produced a structural preservation of high quality, and a drastic reduction of the background due to the planes out of focus. Actually, our experience is that the fluorescent image obtained from a semithin section is comparable to a confocal image (not shown here). Furthermore, unspecific background was strongly reduced by the successive application of glycine and borohydride as blocking agents for free aldehyde groups. In fact, we have verified that, when these treatments were not applied, the direct examination of sections under the fluorescence microscope without any other treatment or staining, produced high levels of autofluorescence.

Immunofluorescent localization of NopA64 showed this protein to be present in the nucleolus (Fig. 1). The conditions of sample preparation allowed a highly precise localization of the labeling, and the definition of subnucleolar structures in which the protein was preferentially located. These structures were the innermost

Fig. 1.- a) Immunofluorescent localization of NopA64 in interphase cells. Semithin section, 2 μ m thick, of an onion root embedded in the resin "Immunobed". The protein is localized in the nucleolus, forming small foci. b) the same microscopic field observed with DAPI staining. Bar indicates 10 μ m.

Fig. 2.- Immunofluorescent localization of NopA64 during mitosis, observed on squashed cells. a), c), e), g), i) correspond to the localization of the protein, and b), d), f), h), j) show the DAPI staining of the same respective cell, allowing an easy identification of mitotic phases. a), b): Prophase, showing the dispersion of the protein. c), d): Metaphase. Arrow points to the nucleolar organizer. e), f): Anaphase. The protein is located at the periphery of chromosomes. g), h): Early telophase. The perichromosomal localization coexists with the appearance of some bodies containing the protein. i), j): NopA64 is localized in prenucleolar bodies. Bars indicate 10 μ m.

Fig. 3.- Ultrastructural immunogold localization of NopA64 on ultrathin sections of onion root cells embedded in LR White. a) and b) show the ultrastructure of the nucleolus in G1 and G2 respectively. The nucleolus in G1 has large heterogeneous fibrillar centers (arrows) surrounded by dense fibrillar component (DFC). Granular component is practically absent. At G2 stage, fibrillar centers are small, homogeneous and numerous (arrows), there is a central "vacuole" (V) and the granular component is abundant (G). Bars indicate 1 μ m. c) Higher magnification of a zone of b) showing the labeling concentrated around FCs (arrows). A few gold particles may occasionally be observed inside FCs (arrowheads). d) Localization of NopA64 in quiescent cells. Labeling appears evenly distributed throughout the nucleolus, which consists only of dense fibrillar component (DFC) and large heterogeneous FCs (arrows). chr: chromatin.



areas of the nucleolus, and could be identified as the dense fibrillar component (DFC) (Fig. 1a). However, the image shows a focal distribution of the protein throughout the DFC, since the pattern of distribution was, in fact, uneven, with higher accumulations detected as very small dots of different brightness. The arrangement of these foci strongly suggests that some unlabeled round areas are left among them. It is tempting to identify these unlabeled areas as fibrillar centers (FCs), but, actually, the structural discrimination of the small FCs typical of onion meristematic cells is out of the range of resolution of the light microscope and should be done at the ultrastructural level (see forward).

NopA64 during mitosis

The distribution of NopA64 in mitotic cells was studied by immunofluorescence on squashed cells, in concert with the visualization of DNA by DAPI reagent, paying special attention to its fate at the time of disassembly of the nucleolus and to its potential presence in structures known to take a part in the postmitotic nucleogenesis (Fig. 2).

In prophase, as the nucleolar components dispersed, the protein was also dispersed. The periphery of the condensing chromosomes was a target of this dispersion (Fig. 2a, b).

In metaphase (Fig. 2c, d) and anaphase (Fig. 2e, f), the protein was excluded from chromosomes, but locally accumulated at their periphery. Two bright spots, observed in metaphase (Fig. 2c), could be identified, most probably, as the nucleolar organizers (NORs).

At early telophase, the linear fluorescent structures of the chromosome periphery condensed progressively in rounded bodies, prenucleolar bodies (PNBs); some of the immunostaining appeared on linear structures and some other on rounded structures. In all cases, it was excluded from chromosomes (Fig. 2g, h). As telophase progressed, all the stained nuclear structures were shown to concentrate in larger rounded bodies, corresponding to the reorganizing nucleoli (Fig. 2i, j).

NopA64 at the electron microscope in relation to differentiation and cell cycle

The *in situ* localization of NopA64 has been also studied at the electron microscope level, by means of the immunogold procedure. Since NopA64 was previously identified as a proliferation-associated protein (De Cárcer, *et al.* 1997), the study has been performed in proliferating *versus* quiescent cells, and in different cell cycle periods of onion proliferating cells. *In situ* labeling has been quantified in order to obtain the density of particles in relevant nuclear and nucleolar structural domains, as well as the relative accumulation of labeling with respect to nucleolar fibrillar centers (FCs).

On onion root meristematic cells (both proliferating and quiescent), the protein appeared restricted to the nucleolus (Figs. 3a-d and 4A). Inside the nucleolus, the dense fibrillar component (DFC) was the preferential target of the anti-NopA64

antibody in all cases investigated, though, occasionally, some particles were found inside FCs (Figs. 3a-d and 4B). In most cases, FCs appeared devoid of labeling, thus confirming our hypothetical interpretation of the results of the immunofluorescence study.

Significant differences in the content of protein, estimated as particle density after immunolabeling, were found in dependence on the proliferation status of the cell (Fig. 4C); proliferating cells (Figs. 3a-c) showed almost double labeling density than quiescent cells (Fig. 3d). A similar situation was found when G1 and G2 periods of the cell cycle were compared, showing that labeling of the nucleolar DFC of G2 cells was 1.4 times the labeling found in G1 cells (Fig. 4D). This comparison was possible in an asynchronous onion root meristem since the morphological features of nucleoli in the two interphase periods are quite different (Sacristán-Gárate *et al.*, 1974); G1 cell nucleoli are characterized by large heterogeneous FCs and very little granular component (GC) (Fig. 3a), whereas G2 cell nucleoli have small homogeneous FCs, have a central nucleolar vacuole and the GC is abundant, surrounding the DFC and also within the vacuole (Fig. 3b).

From the mere visual examination of electron micrographs of immunolabeled nucleoli from proliferating cells at a magnification large enough, a subnucleolar distribution of NopA64 in the surroundings of FCs could be inferred with more or less precision (Fig. 3c). However, the application of the method of the Radial Distribution Function (Markovics *et al.*, 1974; Martín and Medina, 1991), which quantitatively estimated the accumulation of labeling in concentric annuli around the centroid of FCs, evidenced the protein concentrated on the area of transition between FCs and the DFC, as well as in zones of the DFC near FCs (Fig. 6A). This subnucleolar distribution is quite different from that observed in quiescent cells in which the labeling appears to be more dispersed throughout the nucleolar body (Fig. 3d). Radial Distribution Function applied to quiescent cell nucleoli did not allow to define any precise nucleolar domain as preferential target for the antibody. (Fig. 6B).

Expression of NopA64 throughout interphase, estimated by flow cytometry

The analysis of the expression of NopA64 in the three main periods of interphase was estimated by measuring, under the flow cytometer, the fluorescence emitted by isolated nuclei labeled with FITC-coupled anti-NopA64. The values obtained for the protein and DNA (labeled by propidium iodide) were normalized, assigning the value 1 for the G1 period and referring all data to this one. The amount of nuclear NopA64 increases throughout interphase until G2, in which the amount of protein is maximum, almost doubling the G1 value. However, the rate of increase is not uniform, but the highest rate occurs before DNA duplication (S period) (Fig. 5).

It is interesting to note that the difference between G2 and G1 estimated by flow cytometry is higher than the difference obtained by counting the labeling density

on micrographs. This is not an indication of a lack of accuracy of the morphological identification of phases, but, certainly, flow cytometry is a more confident technique than label counting on micrographs.

Electron microscopical co-localization of NopA64 and proliferation-related kinases

As we previously demonstrated, NopA64 is a phosphorylated protein, capable of acting *in vitro* as substrate of casein kinase II and cdc2 kinase, two enzymes whose phosphorylating activity is closely related to cell proliferation events (De Cárcer *et al.*, 1997). For this reason, we thought it would be interesting to investigate the simultaneous localization *in situ* of NopA64 and these two kinases in proliferating cells, by means of an ultrastructural double-labeling strategy. The results showed, in fact, co-localization of the two kinases and NopA64 in the DFC of the interphase nucleolus, in some cases very close to FCs, although in no case co-localization was found at the interior of FCs (Fig. 7a, b).

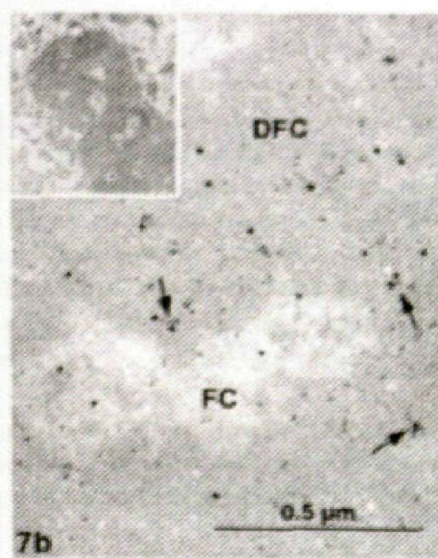
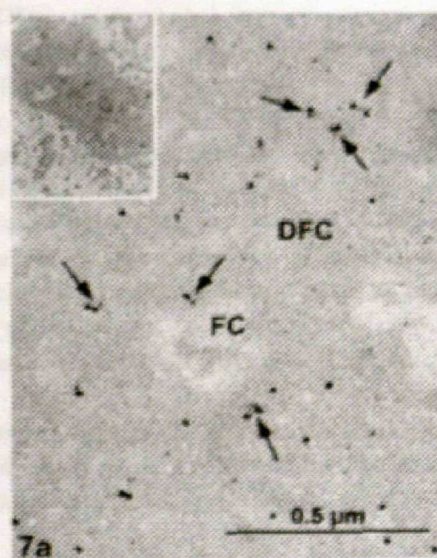
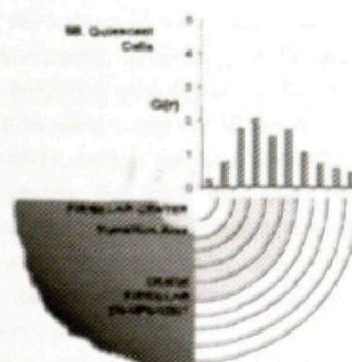
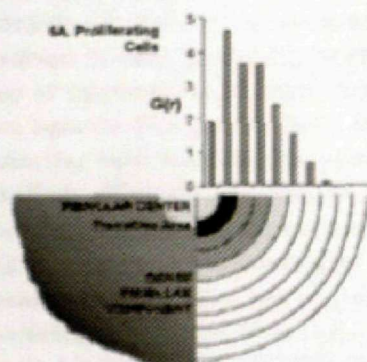
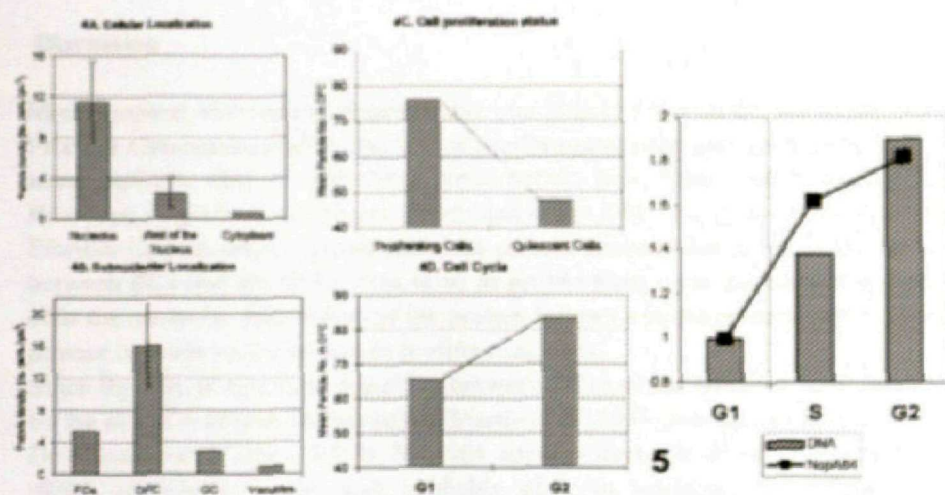
The zones of co-localization coincide with those of the highest accumulation of NopA64. Interestingly, these zones are the structural site of transcription and early processing of pre-rRNA. This could suggest a role of NopA64 phosphorylation in these crucial nucleolar events.

Fig. 4.- Quantitative study on the localization of the protein NopA64, estimated by labeling density, counted on electron micrographs. Labeling is practically restricted to the nucleolus (A) and, within it, to the dense fibrillar component, which is the most labeled nucleolar domain (B). Proliferating cells show much higher amounts of the protein than quiescent cells (C), whereas, during interphase, G2 cells are more enriched in the protein than G1 cells (D). Discrimination of G1 and G2 cells was made with morphological criteria (see Figs. 3a and 3b).

Fig. 5.- Quantitative estimation of the variation of the level of NopA64 throughout interphase, measured by flow cytometry on isolated nuclei. Samples belonging to each phase were discriminated by the amount of DNA, according to their staining with propidium iodide. The level of the protein increases during interphase, but the rate (probably the expression) is higher during the first half (G1-S) than from S to G2. Anyway the top levels are reached just before mitosis.

Fig. 6.- Quantitative evaluation of the distribution of NopA64 in proliferating (A) and quiescent (B) cells, by means of the application of the radial distribution function ($G(r)$) with respect to the "centroid" of FCs. On proliferating cells, the protein accumulates around FCs, with a peak in the transition area FCs-DFC. The distal portions of the DFC show insignificant levels of the protein. On the contrary, on quiescent cells the protein practically does not show a preferential nucleolar domain for its accumulation.

Fig. 7.- Simultaneous co-localization of NopA64 and two kinases which are known to play relevant roles in cell proliferation and cell cycle regulation mechanisms: casein kinase II (a) and cdc2 kinase (b). Labeling of NopA64 is represented by small 5 nm gold particles, whereas large 20 nm particles correspond to the kinase in each case. Insets show an overview of the nucleolus from which a zone is shown magnified to detect the labeling. In both cases, co-localization is observed at the neighborhoods of FCs (arrows), that is in the zones of the highest accumulation of the protein, which are, at the same time, the domains in which transcription and early processing of pre-rRNA take place. However, co-localization is not observed at the interior of FCs. DFC: Dense fibrillar component.



Discussion

Microscopical observation demonstrates that NopA64 lies in the nucleolar Dense Fibrillar Component (DFC), the site of preribosomal precursor processing and, for some authors, also of pre-rRNA transcription (see Shaw and Jordan, 1995). However, NopA64 is not evenly distributed in the DFC, but it accumulates around Fibrillar Centers (FCs). In particular, the protein concentrates in the transition area between FCs and the DFC. This is so in proliferating cells, because in quiescent cells the nucleolar distribution of the protein follows a homogeneous pattern, being present in lower amounts than in proliferating cells.

Since the area of structural transition between FCs and the DFC has been shown to be the site of nucleolar transcription (Martin *et al.* 1989; Martin and Medina, 1991; De Cárcer and Medina, 1999), NopA64 appears likely involved in the early pre-rRNA processing events and, probably also, in nucleolar transcription. The subnucleolar distribution correlates well with the expected localization of a protein involved in early processing of ribosomal precursors, according to the nucleolar map of functional architecture. Interestingly, NopA64 was found in the transition area between FCs and the DFC, the same site in which transcription of ribosomal genes has been found to take place. This location, which has also been found for fibrillarin (Cerdido and Medina, 1995), supports the idea that processing of ribosomal precursors begins when transcription elongation of primary pre-rRNA is still in progress, corresponding to the image of the terminal balls of nascent RNA chains, seen in Miller spreads of nucleolar chromatin, interpreted as pre-rRNA processing complexes. Moreover, co-localization of NopA64 with cdc2 kinase and casein kinase II in the FC-DFC transition area and in the proximal zone of the DFC, suggests that NopA64 phosphorylation occurs in those nucleolar domains that are critical for transcription and early processing.

The fate of NopA64 during mitosis is exactly the same as we have described for components of the nucleolar processing complex, using *in situ* hybridization for pre-rRNA and heterologous antibodies for fibrillarin and nucleolin (Medina *et al.*, 1995). Therefore, NopA64 would accompany other components of this complex, including pre-rRNA, in transit from the parent cell nucleolus to the daughter cell nucleoli, throughout the formation of transitory mitotic structures, such as the chromosomal peripheral sheath and PNBs. Thus, NopA64 can be defined as a "chromosomal passenger protein" (Hernandez Verdun and Gautier, 1994), as well as a protein taking part in nucleologenesis.

Work performed with the technical assistance of Mrs. Mercedes Carnota and Mrs. Nieves Fontúrbel. Supported by the Spanish National Plan for Research, Development and Innovation (Ministry of Science and Technology) Grants No.: ESP1999-0379-C02-02, and BMC2000-1141.

References

- Cerdido A. and Medina F.J.: Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, 103, 625-634, 1995.
- De Cárcer G., Cerdido A., and Medina F.J.: NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta*, 201, 487-495, 1997.
- De Cárcer G. and Medina F.J.: Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J.Struct.Biol.*, 128, 139-151, 1999.
- Geuze H. J., Slot J.W., Van der Ley P.A., and Scheffer R.C.T.: Use of colloidal gold particles in double-labeling immunoelectron microscopy of ultrathin frozen tissue sections. *J.Cell Biol.*, 89, 653-665, 1981.
- Ginisty H., Sicard H., Roger B., and Bouvet P.: Structure and functions of nucleolin. *J.Cell Sci.*, 112, 761-772, 1999.
- Hernandez-Verdun D. and Gautier T.: The chromosome periphery during mitosis. *BioEssays*, 16, 179-185, 1994.
- Markovics J., Glass L., and Maul G.G.: Pore patterns on nuclear membranes. *Exp.Cell Res.*, 85, 443-451, 1974.
- Martin M., Moreno Díaz de la Espina S., and Medina F.J.: Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma*, 98, 368-377, 1989.
- Martin M. and Medina F.J.: A *Drosophila* anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *J.Cell Sci.*, 100, 99-107, 1991.
- Medina F. J., Cerdido A., and Fernández-Gómez M.E.: Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp.Cell Res.*, 221, 111-125, 1995.
- Olson M. O. J.: The role of proteins in nucleolar structure and function. In *The eukaryotic nucleus. Molecular biochemistry and macromolecular assemblies* (Eds. Strauss, P.R. and Wilson, S.H.), The Telford Press, Caldwell, New Jersey, 1991, pp. 519-559.
- Sacristán-Gárate A., Navarrete M.H., and De la Torre C.: Nucleolar development in the interphase of the cell cycle. *J.Cell Sci.*, 16, 333-347, 1974.
- Shaw P. J. and Jordan E.G.: The nucleolus. *Annu.Rev.Cell Biol.*, 11, 93-121, 1995.
- Tuteja R. and Tuteja N.: Nucleolin: a multifunctional major nucleolar protein. *CRC Crit.Rev.Biochem. Mol.Biol.*, 33, 407-436, 1998.